

**QUARTÄRSTRUKTUR
UND WECHSELWIRKUNG ZWISCHEN DEN UNTEREINHEITEN
DES 37 S-HÄMOCYANINS
AUS DER VOGELSPINNE EURYPELMA CALIFORNICUM**

Anette Savel

*Diss. München
1985*

QUARTÄRSTRUKTUR
UND WECHSELWIRKUNG ZWISCHEN DEN UNTEREINHEITEN
DES 37 S-HÄMOCYANINS
AUS DER VOGELSPINNE EURYPELMA CALIFORNICUM

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Fakultät für Biologie
der
Ludwig - Maximilians - Universität
München

vorgelegt von Anette Savel
aus Erlangen

Dezember 1984

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Bernt Linzen
2. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Jürgen Markl

Tag der mündlichen Prüfung: 1.3.1985

1891

Die vorliegende Arbeit wurde im Zusammenhang mit der
Arbeit am Kaiser-Wilhelm-Institut für Medizinische
Forschung in Berlin unter der Leitung von

Dr. med. habil. Dr. med. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil.
Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil.
Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil.
Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil.
Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil.

Verfasser gilt als besonderer Dank Dr. phil. Dr. phil.
Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil.
Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil.
Meinem Vater
Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil.

Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil.
Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil.

Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil.
Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil.
Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil.

Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil.
Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil.
Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil.

D A N K S A G U N G

Die vorliegende Arbeit wurde am Zoologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Bernt Linzen durchgeführt.

Ich bedanke mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Bernt Linzen für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, für sein stetes Interesse an meiner Arbeit, sowie für seine ständige Bereitschaft zu für mich sehr hilfreichen Diskussionen.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. Jürgen Markl für seine hilfreiche Diskussionsbereitschaft und seine freundschaftliche Betreuung, vor allem während des ersten Teils meiner Arbeit.

Herrn Dr. Heinz Decker danke ich für seine Einführung in die Theorie und Praxis der Sauerstoffbindungskurven.

Bei den Mitarbeitern des Labors von Prof. Dr. Ernst van Bruggen bedanke ich mich für die Herstellung von EM-Aufnahmen.

Für die angenehme, freundschaftliche Zusammenarbeit bedanke ich mich bei meinen Kollegen, vor allem bei Herrn Dr. Walter Stöcker und Herrn Dr. Bernhard Kempfer.

E I N L E I T U N G	1
M A T E R I A L U N D M E T H O D E N	8
A. MATERIAL UND CHEMIKALIEN.....	8
B. TIERHALTUNG, HÄMOLYPHEENTNAHME.....	9
C. METHODEN.....	9
1. Immunologische Methoden.....	9
a) Kaninchenimmunisierung und Gewinnung des Antiserums.....	9
b) Immundiffusion.....	10
c) Immunelektrophoresen.....	10
d) Gewinnung der IgG-Fraktion aus Kaninchenserum..	12
e) Gewinnung der F(ab)-Fragmente.....	12
2. Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (PAGE).....	13
a) Analytische PAGE.....	13
b) Präparative PAGE.....	13
c) Bestimmung der Untereinheitenanzahl nach Ferguson (1964).....	14
3. Gelchromatographische Methoden.....	14
a) Gelfiltration.....	14
b) Dünnschichtchromatographie (TLG).....	15
c) Affinitätschromatographie.....	15
4. Sauerstoffbindungskurven.....	16
5. Proteinbestimmung und UV-Spektren	17
6. Dialysen, Puffer, Denaturierungen und Proteinkonzentrierung.....	17
7. Zentrifugationen	18
8. Elektronenmikroskopie.....	18
E R G E B N I S S E	19
A. PARTIELLE DISSOZIATION DES 37 S-HÄMOCYANINS: ZUSAMMENSETZUNG DER DISSOZIATIONSZWISCHENSTUFEN AUS UNTEREINHEITEN.....	19
1. Zusammensetzung des 37 S-Hämocyanins aus Untereinheiten.....	21
2. Bestimmung der Untereinheitenzahl in den Dissoziationszwischenstufen.....	23

3. Zusammensetzung des 19-mers, des 16-mers und des Heptamers aus Untereinheiten - Kurzzeitdissoziation des 37 S-Hämocyansins.....	27
a) Das 19-mer und das 16-mer.....	27
b) Das Heptamer.....	31
4. Zusammensetzung des Dodekamers und des Heptamers aus Untereinheiten - Spaltung mit reduzierenden Reagenzien.....	33
5. Zusammensetzung des Hexamers aus Untereinheiten - Spaltung mit 4 M Harnstoff.....	36
6. Zusammenfassung.....	40
B. UNTERSUCHUNGEN DER DISSOZIATIONSWISCHENSTUFEN AUF IHRE SAUERSTOFFBINDUNGSEIGENSCHAFTEN.....	42
1. Voraussetzungen für die Funktionsbetrachtung der Dissoziationszwischenstufen.....	43
a) Das Hexamer.....	46
b) Das Dodekamer.....	50
c) Das Heptamer.....	60
d) Das 19-mer.....	61
2. Sauerstoffbindungsdaten für die Dissoziationszwischenstufen.....	64
a) Sauerstoffbindungseigenschaften des Hexamers....	65
b) Sauerstoffbindungseigenschaften des Heptamers, des Dodekamers und des 19-mers.....	75
c) Zusammenfassung der Sauerstoffbindungsdaten für alle Dissoziationszwischenstufen	85
3. Kontrollversuche.....	88
a) Sauerstoffbindungsverhalten des 37 S-Hämocyansins nach Carboxymethylierung.....	88
b) Sauerstoffbindungsverhalten von aus PA-Gelen eluiertem 37 S-Hämocyanin.....	89
c) Dissoziation und Reassoziaton des Hexamers.....	89
C. DIE SAUERSTOFFBINDUNGSEIGENSCHAFTEN VON 37 S-HÄMOCYANIN MIT EINGEBAUTEN MODIFIZIERTEN UNTER-EINHEITEN.....	92
1. Kopplung untereinheitenspezifischer F(ab)-Fragmente an 37 S-Hämocyanin.....	92
2. Reassoziationsversuche mit apo-Untereinheiten.....	99
a) Vorversuche	99
b) Einbau von Untereinheit apo-e.....	104

D. SAUERSTOFFBINDUNGSKURVEN DES NATIVEN 37 S-HÄMOCYANINS:.....	110
1. Sauerstoffbindungsverhalten des Hämocyanins im Bereich und unterhalb des isoelektrischen Punktes.....	110
2. Einfluß von 10 mM Calcium und 10 mM Magnesium auf das Sauerstoffbindungsverhalten des 37 S- Hämocyanins.....	113
E. THEORETISCHE BETRACHTUNGEN.....	115
1. Natives 37 S-Hämocyanin.....	117
2. Dissoziationszwischenstufen.....	119
D I S K U S S I O N.....	123
A. DIE QUARTÄRSTRUKTUR DES 37 S-HÄMOCYANINS.....	123
B. ZUR DISSOZIATION DES 37 S-MOLEKÜLS.....	127
C. WECHSELWIRKUNGEN ZWISCHEN DEN UNTEREINHEITEN.....	130
1. Der Hillkoeffizient- das Problem der Alterung und Schädigung des 37 S-Moleküls.....	130
2. Die Rolle der einzelnen Untereinheiten.....	133
3. Kooperativität bei Dissoziationszwischenstufen....	135
4. Van Holde-Diagramm und allosterische Einheit.....	141
5. Vorstellungen über die Beladung der einzelnen Untereinheiten mit Sauerstoff, und die daraus folgenden allosterischen Wechselwirkungen.....	143
Z U S A M M E N F A S S U N G.....	147
L I T E R A T U R.....	151

Verwendete Abkürzungen

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TLG	Thin-layer-gelchromatography
PEG	Polyäthylenglycol
PBS	Phosphate buffered saline
UE	Untereinheiten
Hc	Hämocyanin
Hly	Hämolymphe
Hb	Hämoglobin
UZ	Ultrazentrifuge
UV	Ultraviolett
IgG	Immunglobulin G
PCMB	Parachloromercuribenzoat
o.D.	Optische Dichte
SDS	Sodiumdodecylsulphat
EM	Elektronenmikroskop
F(ab)	Fragment antigen binding
F(c)	Fragment crystallizable

E I N L E I T U N G

Eine der wichtigsten biologischen Funktionen ist die Versorgung der Zellen eines Lebewesens mit Sauerstoff. Abgesehen von den obligat anaeroben Bakterien ist Sauerstoff für jeden Organismus lebensnotwendig. Überschreitet ein Organismus eine bestimmte Größe, so daß die Sauerstoffversorgung durch Diffusion nicht mehr gewährleistet ist, gelangt der Sauerstoff auf speziellen Transportwegen, den Tracheen oder Blutgefäßen, in die Gewebe. Die Sauerstofftransportfunktion im Blut übernehmen oft Atmungspigmente, hochmolekulare, oligomere Proteine, die Sauerstoff reversibel binden können. Im Laufe der Evolution gelangten neben dem weniger bedeutenden Hämyerithrin zwei Gruppen von Atmungspigmenten zu weiter Verbreitung: die Hämoglobine bei Wirbeltieren und sporadisch bei Vertretern fast aller Tierstämme einschließlich der Protozoen, und die Hämocyane bei Placophoren, Gastropoden, Cephalopoden, Crustaceen, Xiphosuren und Arachniden. Obwohl sich Hämoglobine und Hämocyane in ihrer Funktion als Sauerstofftransportproteine entsprechen, weisen sie in ihrer Struktur große Unterschiede auf. So wird der Sauerstoff bei den Hämoglobinen an ein Eisen-Protoporphyrin-System gebunden, bei den Hämocyaninen übernehmen zwei Kupferatome die Sauerstoffbindung. Der Sauerstoff-Kupfer-Komplex verleiht den Hämocyaninen ihre blaue Farbe. Hämocyane kommen im Gegensatz zu den Hämoglobinen niemals zellulär gebunden vor, sondern sind stets als Riesenmoleküle von Molekulargewichten bis über 9×10^6 in der Hämolymphe gelöst. Diese Moleküle bestehen aus vielen Untereinheiten, von denen jede ein aktives Zentrum, das bedeutet zwei Kupferatome besitzt. Bei den Arthropodenhämocyaninen treten Aggregate von sechs, zwölf, vierundzwanzig und achtundvierzig Untereinheiten auf, die in der Ultrazentrifuge mit 16 S, 24 S, 37 S und 60 S sedimentieren. Die Untereinheiten haben einen Sedimentationskoeffizienten von 5-6 S, ihr Molekulargewicht liegt bei 70000 - 80000. Einen Über-

blick über die verschiedenen Hämocyanintypen und ihre Funktion geben Ghiretti (1968), Van Holde und van Bruggen (1971), Van Holde und I. Miller (1982), Mangum (1983) und Ellerton et al. (1983).

Ein interessantes Forschungsgebiet stellt die Funktion der Atmungsproteine dar. Schon seit vielen Jahren beschäftigen sich zahlreiche Wissenschaftler mit den Reaktionen zwischen Proteinen und ihren Liganden. Da es bei den Atmungsproteinen keine Weiterreaktion des Substrates zu Zwischen- und Endprodukten gibt, vereinfacht sich bei ihnen die Betrachtung auf die reversible Bindung des Sauerstoffs und ihre Beeinflussung durch Effektoren. Das Hämoglobin war über sieben Jahrzehnte lang das wichtigste Objekt für die Entwicklung von Theorien über sigmoide Bindungskurven, d.h. über das Verhalten von allosterischen Proteinen. Der folgende Ausflug in die Geschichte der allosterischen Bindungsfunktionen umfasst nur die wichtigsten theoretischen Ansätze, von denen es zahlreiche Varianten gibt.

1903 schlug Hüfner die Gleichgewichtsreaktion $\text{Hb} + \text{O}_2 \xrightleftharpoons{K'} \text{HbO}_2$ für die Beladung des Hämoglobins mit Sauerstoff vor. Damit konnte jedoch die Reaktion des Hämoglobins mit Sauerstoff nicht beschrieben werden. Die Sauerstoffdissoziationskurve des Hämoglobins ist sigmoid, was auf Häm-Häm-Wechselwirkungen rückschließen läßt.

So folgerte A.V. Hill bereits 1910, daß das Hämoglobin mehrere Sauerstoffbindungsstellen besitzen muß und schlug eine Reaktion n-ter Ordnung vor: $\text{Hb}_n + n\text{O}_2 \rightleftharpoons (\text{HbO}_2)_n$. Aus dem Massenwirkungsgesetz folgt:

$$K = \frac{(\text{HbO}_2)_n}{(\text{Hb})_n \times (\text{pO}_2)^n} \quad \text{oder} \quad K \times (\text{pO}_2)^n = \frac{y}{1-y}$$

$$y = (\text{HbO}_2)_n; \quad 1-y = (\text{Hb})_n$$

Obwohl auch mit dieser Gleichung die Sauerstoffbindungskurve des Hämoglobins nicht beschrieben werden kann, wird ein aus der Hill-Gleichung abgeleitetes Diagramm (Hill-Plot)

bis heute verwendet, um Protein-Liganden-Gleichgewichtskurven zu charakterisieren und um den empirischen Wert n für die Kooperativität, das heißt für die Wechselwirkungen der Untereinheiten miteinander zu bestimmen.

Auf Grund von osmometrischen Messungen fand Adair 1925, daß das Hämoglobin als Tetramer mit einem Molekulargewicht von 64000 vorliegt. Er postulierte, daß der Sauerstoff im Hämoglobin in vier aufeinanderfolgenden Schritten gebunden wird und er nahm unterschiedliche Werte für die vier Gleichgewichtskonstanten ($K_1 - K_4$) an. Mit seiner Theorie setzte Adair einen Markstein in der Hämoglobinforschung, indem er erstens eine Beziehung zwischen Funktion und dem Aufbau eines Proteins aus Untereinheiten herstellte, zweitens die Wechselwirkungen der Untereinheiten als wichtigen Faktor erkannte und drittens Versuche zur Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten anstrebte.

Unter dem Begriff "allosterische Modelle" werden Modelle zusammengefasst, die homotrope und heterotrope Wechselwirkungen mit Hilfe mathematischer Gleichungen erklären. Die Reaktion eines Proteins mit einem Liganden muß nach diesen Modellen unter zwei Gesichtspunkten betrachtet werden: erstens die auf Grund des Massenwirkungsgesetzes zu betrachtende chemische Bindung des Liganden an die Proteinuntereinheit, und zweitens die mit der Ligandenbindung verbundene Konformations- und Funktionsänderung der Untereinheit oder des Oligomers.

Das Modell von Monod, Wyman und Changeux (1965), kurz MWC-Modell, geht von der Grundannahme symmetrisch gebauter Proteine aus, die sich aus identischen Einheiten, den Protomeren, zusammensetzen, welche sich an gleichwertigen Positionen befinden. Das bedeutet, die Moleküle besitzen wenigstens eine Symmetrieachse. Zu jedem Liganden gehört nur eine Bindungsstelle auf jedem Protomer.

Das Oligomer kann sich in zwei verschiedenen Zuständen, dem R-(=relaxed) und dem T-(=tense) Zustand befinden, zwischen denen ein Gleichgewicht herrscht ($L = \frac{[T]}{[R]}$; L = allosterische Konstante), und die sich durch unterschied-

liche Affinitäten zu den Liganden auszeichnen. Bei der Bindung von Liganden oder durch die Bindung von Effektoren wird eine der beiden Formen aus dem Gleichgewicht gezogen. Da beide Zustände unterschiedliche Affinitäten zu jedem Liganden besitzen, ändert sich die Ligandenaffinität der Gesamtpopulation, was sich im kooperativen Bindungsverhalten äußert. Aus Symmetriegründen muß das Protein nach dem MWC-Modell stets vollständig von dem einen in den anderen Zustand übergehen, so daß Hybridzustände ausgeschlossen sind.

Koshland et al. (1966) gingen mit ihrem Modell von entgegengesetzten Voraussetzungen für eine Protein-Liganden-Reaktion aus: bei der Reaktion einer Untereinheit mit einem Liganden tritt zunächst nur in dieser Untereinheit eine Konformationsänderung auf, welche aber die Konformation des übrigen Oligomers beeinflussen und die Reaktionsbereitschaft der benachbarten Untereinheiten ändern kann. Die Konformationsänderungen der Untereinheiten geschehen sequentiell mit der Bindung eines Liganden. Das Modell schließt das Auftreten von Hybridzuständen ein.

Bei großen Proteinen mit vielen Untereinheiten, wie zum Beispiel beim 37 S-Hämocyanin von *Eurypelma californicum* mit seinen 24 Untereinheiten wird die Sauerstoffbeladungsfunktion nach dem Koshland-Modell sehr kompliziert. Wegen dieser "Unhandlichkeit" der Beladungsfunktion und einer gewissen Beliebigkeit bei der Wahl der Konstanten wird im Allgemeinen das MWC-Modell für die funktionelle Beschreibung von hochmolekularen oligomeren Proteinen vorgezogen.

Auch an Hämocyaninen wurden viele funktionelle Untersuchungen angestellt und zahlreiche Versuche unternommen, ihr Sauerstoffbindungsverhalten mit Hilfe von allosterischen Theorien zu erklären. Einen Überblick geben Van Holde und Miller (1982).

Das Hämocyanin der Vogelspinne *Eurypelma californicum* gehört mit seinen 24 Untereinheiten (Sedimentationskonstan-

te $S_w^{20} = 36,7$) zu den größten Arthropodenhämocyaninen. Es ist einheitlich und das einzige Atmungsprotein in der Hämolymphe. Durch alkalische Dissoziation kann es in seine Untereinheiten zerlegt werden. Die Untereinheiten sind heterogen; sie setzen sich aus sieben verschiedenen Typen zusammen, die mit a, b, c, d, e, f und g bezeichnet werden; b und c treten als Heterodimer bc auf, f liegt zum Teil als Homodimer ff vor. Die Mengenverhältnisse der einzelnen Untereinheiten waren zu Beginn dieser Arbeit bis auf das Verhältnis a:g bekannt: 8 a+g, 2 bc, 4 d, 4 e, und 4 f bilden vier Hexamere, die sich zum 24-mer zusammenschließen. (Schneider et al., 1977; Markl et al., 1979; Lamy et al., 1979; Markl et al., 1980). Die Sauerstoffbindungsfunktion des nativen Eurypelma-Hämocyanins sowie der einzelnen Untereinheiten wurden von Loewe (1978), Decker et al., (1979) und Markl et al. (1981a) untersucht. Mit einem n_{50} von ca 7-8, bei sehr guten Präparationen bis 10, bei pH 8,0 und 20°C ist dies Hämocyanin eines der kooperativsten bekannten Proteine. Daneben zeigt es einen ausgeprägten normalen Bohreffekt ($\Delta \log p_{50} / \Delta pH = -1,2$ bei 25°C und zwischen pH 8,0 und 8,2). Die einzelnen Untereinheiten zeigen keinen Bohreffekt und eine viel höhere Affinität zu Sauerstoff. Gerade die hohe Kooperativität des nativen Hämocyanins und die Zahl verschiedener Untereinheiten machen dieses Protein zu einem interessanten Untersuchungsobjekt im Hinblick auf zwei große Fragenkomplexe, deren Klärung mit Hilfe dieser Arbeit näher gekommen werden soll.

Die erste Frage beschäftigt sich mit der Quartärstruktur des 37 S-Moleküls. Da das native Hämocyanin einheitlich ist, und die Untereinheiten in einem klaren stöchiometrischen Verhältnis stehen, müssen die Untereinheiten nicht nur allesamt in jedem Hämocyaninmolekül vorkommen, sondern auch jede einen ganz bestimmtem Platz einnehmen. Welche Positionen nehmen also die sieben Untereinheiten im Molekül ein und welche Rolle spielen sie beim Aufbau des 24-mers? Drei Versuchsansätze sollten zur Aufklärung der Quar-

tärstruktur beitragen: 1. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuche sollten über die Analyse der Untereinheitenzusammensetzung von Dissoziationszwischenstufen einen Einblick in den strukturellen Aufbau des 37 S-Hämocyanins geben. 2. Die Reassoziaton ausgehend von isolierten Untereinheiten und die Untersuchung der entstandenen Reassoziationsprodukte sollten die Rolle jeder Untereinheit beim Aufbau des Oligomers klären (Markl et al., 1982). 3. Schließlich wurden spezifische Antikörper gegen einzelne Untereinheiten an das intakte 37 S-Hämocyanin gekoppelt, und die markierten Moleküle anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen analysiert (Markl et al., 1981c).

Jenseits der Quartärstruktur steht die Frage nach der Funktionsweise und den allosterischen Eigenschaften dieses großen Proteins. Einige Parameter der Sauerstoffbindung, wie Kooperativität, Bohr-Effekt, Einfluß von Ionen und Metaboliten sowie der Temperatur sind für die Funktionsweise des nativen Eurypelma-Hämocyanins bereits beschrieben worden (Loewe 1978, Decker 1981). Unklarheit herrscht jedoch hinsichtlich der allosterischen Einheit. Wieviele Untereinheiten müssen miteinander in Wechselwirkung treten, damit das für das 37 S-Hämocyanin charakteristische Sauerstoffbindungsverhalten zustande kommt? Erste Versuche zur Frage der allosterischen Einheit wurden für das Eurypelma-Hämocyanin 1981 von Decker durchgeführt. Er wertete Sauerstoffbindungskurven des nativen Hämocyanins mit Hilfe eines von K.E. Van Holde vorgeschlagenen Diagramms (1978 briefliche Mitteilung an B. Linzen), das durch Umformung der MWC-Gleichung entsteht, aus und bestimmte so die allosterische Einheit für das 37 S-Hämocyanin mit $N = 8$ Untereinheiten.

Im Gegensatz zu diesen theoretischen Berechnungen stehen die Versuche, die ich auf der Suche nach der allosterischen Einheit in der vorliegenden Arbeit beschreiben werde. Dissoziationszwischenstufen des 37 S-Hämocyanins, deren Untereinheitenzusammensetzung im ersten Teil dieser Arbeit ge-

klärt wird, also definierte Bruchstücke, werden auf ihre Funktionsparameter bei der Sauerstoffbindung untersucht, um festzustellen, welche strukturellen Voraussetzungen für das charakteristische Sauerstoffbindungsverhalten des 37 S-Hämocyanins bestehen. Sind für die Funktion des 37 S-Moleküls alle 24 Untereinheiten nötig, oder sind bereits Zwischenstufen in der Lage, den Sauerstoff in der charakteristischen Art und Weise zu binden? Nach den Berechnungen von Decker ($N=8$) wäre zu erwarten, daß bereits das Halbmolekül (12 Untereinheiten) die allosterische Einheit darstellt. Die Kenntnis der funktionellen Eigenschaften von Dissoziationszwischenstufen, also kleineren Untereinheitenverbänden, könnte vielleicht sogar Aufschlüsse geben über die Rolle, die die einzelnen Untereinheiten bei der Sauerstoffbindung spielen. Wenn die Position der sieben verschiedenen Untereinheiten für den strukturellen Aufbau des 37 S-Moleküls entscheidend ist, so wäre zu erwarten, daß auch der funktionelle Beitrag jeder einzelnen Untereinheit eng mit ihrer Position im Molekül zusammenhängt. Welche Untereinheiten sind verantwortlich für die hohe Kooperativität, für den Bohr-Effekt oder die Wechselwirkung mit anderen Effektoren? Oder sind vielleicht funktionell gesehen alle Untereinheiten gleichwertig, und nur die Anzahl der Untereinheiten entscheidend? Zur Beantwortung dieser Fragen sollen erste Versuche beitragen, bei denen die Sauerstoffbindungscharakteristika von 37 S-Molekülen untersucht werden, in die modifizierte, zum Teil an der Sauerstoffbindung nicht mehr beteiligte Untereinheiten eingebaut sind.

Im theoretischen Teil der Arbeit werden Sauerstoffbindungskurven mit Hilfe des van Holde-Plots ausgewertet, um die Frage zu klären, inwieweit das Sauerstoffbindungsverhalten des 37 S-Hämocyanins sowie der Dissoziationszwischenstufen im Sinne der MWC-Theorie zu erklären ist.

M A T E R I A L U N D M E T H O D E N

A) MATERIAL UND CHEMIKALIEN

Alle verwendeten Chemikalien waren von p.A. Qualität. Sie wurden von den Firmen Merck und Fluka bezogen mit Ausnahme von:

Filterpapier (Pufferbrücken)	Whatman
Gel Bond Film	Johnson
Agarose M	LKB-Produkte, Bromma, Schweden
Plastic Plates	"
Tris/Acryl	"
Visking Dialyseschlauch	Serva, Heidelberg
Coomassie Brilliant Blue	"
Biogel A 1,5 m	Biorad, Richmond, Californien
Biogel A 5 m	"
Biogel A 15 m	"
Sephadex G 150 sf	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Sephadex G 200 sf	"
Stickstoff	Linde, München
Sauerstoff	"
5% Sauerstoffreichgas	"
pO ₂ -Elektroden	Bachofer
Teflonmembran	Eschweiler
Papain	Millipore, Freehold, N. I., USA
Narcoren	IAFA-Merieux, Laupheim
Freund's Adjuvans "Bactocomplete"	Difco, Detroit, USA
Bromcyan	Sigma Chemicals, Taufkirchen
Polyethylenglycol (PEG)	"
Natriumdodecylsulfat (SDS)	"

B) TIERHALTUNG; HÄMOLYPHEENTNAHME

Die Vogelspinnenart *Eurypelma californicum* stammt aus dem Süden der USA. Ihre Haltung wurde von Loewe und Linzen (1973) beschrieben. Die Hämolymphe wurde durch Punktion des dorsal gelegenen Herzens gewonnen, nachdem die Tiere ca. eine Stunde bei 4°C gehalten worden waren. Sofort nach der Hämolymphegewinnung wurden die Zellen mit einer Eppendorf-Zentrifuge (zwei Minuten bei 12000 g) abzentrifugiert, um eine Gerinnung zu vermeiden. Der Überstand wurde für weitere Versuche verwendet. Die Proben wurden entweder frisch weiterverarbeitet oder bei 4°C gelagert.

C) METHODEN

1. Immunologische Methoden

a) Kaninchenimmunisierung und Gewinnung des Antiserums

Für immunologische Versuche wurden Kaninchen der Rasse Chinchilla bastard von der Firma Imrich, Putzbrunn bezogen. Die ausschließlich weiblichen Tiere wurden einzeln in Ställen gehalten und mit Wasser und Trockenfutter (Standard-Diät Kaninchen der Firma ALTROMIN, Lage) ernährt.

Für die Gewinnung von Antikörpern gegen einzelne Hämocyaninuntereinheiten oder gegen Hämocyanindissoziat wurden die Kaninchen dreimal mit ca. 1 mg Protein immunisiert. Die Immunisierungen erfolgten im Abstand von 14 Tagen durch Einspritzen des Proteins unter die Rückenhaut in einem Volumen von 0,5 - 1,0 ml. Bei der ersten Immunisierung wurde der Proteinlösung volumengleich eine Emulsion aus Freund's Adjuvans zugesetzt. Zwei Tage nach der letzten Injektion wurde aus der Ohrvene Blut entnommen und im Ouchterlony-Diffusionsverfahren (s.u.) untersucht. War das Antiserum zufriedenstellend, so wurden die Kaninchen nach Betäubung

mit Narcoren über die Ohrvene ausgeblutet. Nach Absitzen des Blutkuchens über Nacht bei 4°C wurde das Serum abpipetiert und nach zwei minütigem Abzentrifugieren bei 12000 g in 1 ml-Portionen eingefroren.

b) Immundiffusion

Die Überprüfung des Antikörpertiters fand nach dem Ouchterlony-Diffusionsverfahren (1958) statt. Eine 1%ige Agarose M-Lösung in 0,12 M Natriumveronal/Veronal-Puffer, I=0,02, pH=8,6 (20,6 g Na-Veronal + 5 g Veronal + 1 g NaN₃ ad 1 L) wurde auf einen Objektträger gegossen. In ausgestanzten Löchern (Durchmesser 4 mm, Abstand 6 mm) läßt man das Antiserum unverdünnt und in den Verdünnungen 1:1, 1:3, und 1:7 gegen ca. 20 µg Antigen über Nacht diffundieren. Der Antikörpertiter ist in Ordnung, wenn auch bei der 1:7 Verdünnung ein Präzipitat zu erkennen ist.

c) Immunelektrophoresen

Theorie, Methodik und Techniken der Immunelektrophorese wurden von D.M.Weir, Handbook of Experimental Immunology beschrieben. Angewandt wurde die "Crossed"- Elektrophorese nach Laurell (1965) und Weeke (1973), sowie die "Crossed-Line"- Elektrophorese nach Kroll (1973 a,b).

Veronalpuffer: Stammlösung, pH 8,4 - 8,5

103 g Natriumveronal + 20 g Veronal + 5 g NaN₃ mit H₂O dest. ad 5 L.

Arbeitslösung = Elektroden- und Gelpuffer

1 Teil Stammlösung + 2 Teile H₂O dest.

Gel: 1 % Agarose in Veronalpuffer (Arbeitslösung) kochen; bei 50°C flüssig halten.

50 ml heißes Agarosegel wurden auf eine 26 x 12,6 x 0,2 cm große, waagrecht liegende Glasplatte gegossen. Nach Erstarren des Agars wurden mit Hilfe einer Schablone Probenlöcher ausgestanzt (ø 2-4 mm für 5-20 µl Probenvolumen), in welche die Proteinproben pipettiert wurden. Als Referenz diente

5 μ l Bromphenolblaulösung. Die Elektrophorese fand in einer LKB-Multiphor-Apparatur statt; Pufferbrücken aus Whatman Nr.1 Filterpapier stellten den Kontakt zwischen Elektrodenpuffer und Gel her. Die Spannung während der ersten Elektrophoresedimension betrug 6 V/cm bei stark gekühlter Unterlage. Die Elektrophorese wurde nach 5 cm Laufstrecke des Bromphenolblaus gestoppt, die Gelstücke mit Hilfe der Schablone ausgeschnitten und einzeln auf LKB-Plastic-Plates (94 x 83 x 0,1 mm) übertragen. Für "Crossed-Line" Versuche wurde aus den Gelstücken eine Rinne ausgeschnitten, in die antigenhaltige Agaroselösung pipettiert wurde. 7 ml 55°C heißes, antikörperhaltiges Agarosegel wurden angegossen, und nach Erstarren der Agarose die zweite Dimension gestartet. Versuchsdauer: 12 - 18 Stunden bei 2 V/cm. Anschließend wurden die Gelplatten nach folgender Vorschrift behandelt:

- 10 min Pressen unter Filterpapier,
- 20 min Spülen in 0,6 %iger NaCl-Lösung,
- 10 min Spülen in dest. Wasser,
- 15 min Trocknen unter Filterpapier,
- 15 min Trocknen mit heißem Föhn,
- 5 min Färben (Färbelösung: 200 ml Methanol + 50 ml
Eisessig + 2,5 g Coomassie BB ad 500
ml dest. Wasser),
- 5 min Spülen in dest. Wasser,
- Entfärben in Methanol/Eisessig/Wasser = 4:1:5
- Spülen in dest. Wasser,
- Trocknen unter heißem Föhn.

Für geringe Materialmengen kamen sogenannte "Minis" nach B.Kempton (1983) zur Anwendung: Plattengröße, Gelvolumen, Antigen- und Antikörpermengen wurden auf ein viertel reduziert.

Zur Quantifizierung der Untereinheiten wurden die Präzipitatgipfel mit Hilfe eines Tektronix TEK 31- Tischrechners mit angeschlossenem Digitalisiertablett (Summagraphics) planimetrisch integriert. Das Programm hierzu erstellte H.Decker.

d) Gewinnung der IgG-Fraktion aus Kaninchenserum

Die Gammaimmuglobuline wurden durch Aussalzen mit Natriumsulfat aus dem Serum gewonnen (Kekwick 1940). Dazu wurden gleiche Volumina Serum und bei Raumtemperatur in 0,2 M Phosphatpuffer, pH 8,0 (33,6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ + 1,46 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 1 \text{H}_2\text{O}$ ad 1 L) gesättigte Natriumsulfatlösung langsam gemischt, das Präzipitat 10 min bei 12000 g abzentrifugiert und in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 8,0 aufgenommen. Nachdem unlösliche Bestandteile abzentrifugiert waren, wurde die Fällung wiederholt, diesmal mit einer gesättigten Natriumsulfatlösung in 0,1 M Phosphatpuffer pH 8,0. Die IgG-Lösung wurde entsalzt und gegen einen geeigneten Puffer dialysiert.

e) Gewinnung der F(ab)- Fragmente

Aus der IgG-Fraktion wurden die F(ab)- Fragmente nach Porter (1959) durch Spaltung mit 1 Gew.% Papain erhalten.

Spaltpuffer: 0,1 M Natriumacetat
1 mM Cystein
2 mM EDTA

Die Spaltung dauerte 16 Stunden bei 37°C und wurde durch Zugabe von 1 mM 4-Hydroxymercuribenzoat gestoppt. Nach Entfernung niedermolekularer Bestandteile durch Dialyse gegen 0,1 M Tris/HCl- Puffer, pH 8,0, wurden die F(ab)- Fragmente mittels der "Spot-Technik" (Elwing et al. 1977) auf ihre Funktionsfähigkeit geprüft. Die F(c)- Fragmente wurden nicht abgetrennt.

"Spot-Technik":

An eine mit 70%igem Alkohol gereinigte Acrylschale wurde Antigen (0,1 mg/ml) in 0,8%iger Natriumchloridlösung 30 Minuten bei 37°C adsorbiert. Danach wurde mit dest. Wasser gespült und die Schale fast getrocknet. Die F(ab)- Fragment-Lösung wurde in 5 µl Tropfen aufgetragen, und die Acrylschale 60 Minuten bei 37°C in einer Feuchtekammer inkubiert. Danach wurde die Schale eine Minute dem Dampf von 60°C heißem Wasser ausgesetzt, mit dest. Wasser gespült und er-

neut eine Minute über 60°C heißes Wasser gehalten. An den Stellen, an denen die kleinen Wassertröpfchen zu großen Tropfen zusammengelaufen waren, hatten die F(ab)- Fragmente mit dem Antigen reagiert.

2. Polyacrylamidgelelektrophoresen (PAGE)

a) Analytische PAGE

Für die analytische PAGE wurden Polyacrylamidplattengele mit einer Schichtdicke von 1,5 mm verwendet. Die Elektrophoresen wurden in einer Apparatur der Firma Hölzl durchgeführt. Sie erfolgten entweder bei pH 8,4 nach einer Methode von Laemmli (1970) mit oder ohne SDS in linearen Acrylamidkonzentrationsgradienten von 5-10 % (= Gelsystem II), oder bei neutralem pH im System Nr.6 nach Maurer (1968) in kontinuierlichen Acrylamidkonzentrationen von 3,0, 3,5, 3,7, 4,0 oder 4,5 % (= Gelsystem Nr. I). Die Elektrophoresedauer betrug 4 Stunden bei 200-250 V; die günstigste Auftragsmenge betrug ca. 10 µg Protein/Bande; das Auftragsvolumen betrug 10-20 µl. Die Gele wurden in 25 %iger Trichloressigsäure (TCA), die bei SDS-Gelelektrophoresen 1%, bei sonstigen Gelen 0,1 % Coomassie Brilliant Blue enthielt, angefärbt (ca. 2 Stunden). Mit Eisessig/Methanol/Wasser (3/2/35) wurde wieder entfärbt.

b) Präparative PAGE

Zur präparativen Isolierung von Proteinbanden aus Polyacrylamidgelen wurde die Proteinlösung auf die ganze Geloberfläche aufgetragen. Proteinmengen von 1-4 mg in einem Volumen von 500-1000 µl erwiesen sich als günstig. Gel-systeme siehe 2.a); Dauer der Elektrophorese 3-4 Stunden bei 150 V und 4°C. Nach der Elektrophorese wurden am Rand

und in der Mitte Gelstreifen herausgeschnitten und angefärbt. Die Proteinbanden wurden dann aus dem ungefärbten Gel auf der Höhe der angefärbten Banden herausgeschnitten. Zur Elution des Proteins wurden die Gelstreifen durch eine Spritze ($\emptyset$ der Kanüle 1 mm) gepresst, in 500 μ l Puffer suspendiert und über Nacht bei 4°C stehen gelassen. Das Gel wurde abzentrifugiert und die Proteinlösung nochmals gefiltert.

c) Bestimmung der Untereinheitenzahl nach Ferguson (1964)

In verschiedenprozentigen Gelen (Gelsystem I), (3,0, 3,5, 4,0, 4,5%) wurden die R_f -Werte für die Proteine mit unbekannter Untereinheitenzahl sowie für die Proteine mit bekannter Untereinheitenzahl bestimmt. Die korrigierten R_f -Werte ($10 \times R_f / f$) wurden auf halblogarithmischem Papier gegen die Gelkonzentration aufgetragen, und die Steigung der Geraden bestimmt. In einem Diagramm, in dem die Steigungen der Geraden gegen die Untereinheitenzahl aufgetragen wurden, ergibt sich eine Gerade, und die Untereinheitenzahlen der unbekannten Proteine können durch Vergleich mit den Eichsubstanzen bestimmt werden.

* f =Bromphenolblau-Front

3. Gelchromatographische Methoden

a) Gelfiltrationen

Zur säulenchromatographischen Auftrennung von Dissoziationszwischenstufen sowie zur Isolierung von 37 S-Hämocyanin wurden 1,5 m lange Säulen mit einem Durchmesser von 1,5 cm verwendet, die mit Biogel A 1,5, 5 oder 15 m gefüllt waren. Die Fraktionsgröße betrug in der Regel 2,5 ml bei unterschiedlicher Elutionsgeschwindigkeit.

Zur Abtrennung von Salzen wurden 1 cm dicke, 20 cm lange Tris/Acryl- Säulen verwendet. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug ca. 7 ml / Stunde.

b) Dünnschichtchromatographie (TLG)

Die Dünnschichtchromatographie wurde in einer Apparatur der Firma Pharmacia nach deren Anweisungen durchgeführt. Ich verwendete Sephadex-Gele G 150 bzw 200 superfine, 0,6 mm dick, sowohl für die analytische Auftrennung von Dissoziationszwischenstufen als auch für die präparative Abtrennung von F(ab) Komplexen. Der Neigungswinkel der Platte betrug 15-30°; die Laufzeit betrug 5-8 Stunden. Der Abklatsch wurde mit Filterpapier Whatman 3 MM angefertigt und nach Gebrauchsanweisung gefärbt und entfärbt. Bei der präparativen TLG wurden nur Gelstreifen angefärbt, und die Proteinbanden auf der Höhe der gefärbten Banden ausgekratzt, in Puffer suspendiert, und die Proteinlösung durch Filtration von Gelbestandteilen gereinigt.

c) Affinitätschromatographie

Für die Gewinnung spezifischer IgGs gegen einzelne Erythrocyten-Antigenen verwendete ich die Affinitätschromatographie (March et al. 1974, Johnson and Garvey 1977). An in 2 M Natriumacetat suspendiertes BioGel A 5 m wurde im Eisbad Bromcyan in 2 M Acetonitril gekoppelt (2 g Bromcyan/5 ml Gel). Die Suspension wurde nach 13-minütigem Rühren im Eisbad abgenutscht und mit dest. Wasser sowie Bicarbonatpuffer pH 9,0 gewaschen. Die Proteinkopplung erfolgte bei 25°C durch Zugabe von Hämocyanindissoziat in Bicarbonatpuffer pH 9,7 (5 mg Protein/ml Gel). Nach 2-stündigem Rühren bei 25°C verblieb die Suspension 20 Stunden bei 4°C. Das mit Hämocyanindissoziat gekoppelte Gel wurde anschließend bei 25°C mit einer Lösung aus 0,125 M Borat + 0,9 % Natriumchlorid, mit 0,1 M Natriumacetat + 0,5 M Natriumchlorid-Lösung, mit 2 M Harnstoff + 0,5 M Natriumchlorid-Lösung sowie mit Bicarbonat + 0,5 M Natriumchlorid-Puffer, pH 9,7 gewaschen, um nicht gebundenes Protein zu entfernen. Nach dem letzten Abnutschen wurde das Gel in Phosphat-Buffered-Saline (PBS), 0,1 M, pH 7,4 aufgenommen und in * 2 g Bromcyan in 5 ml Acetonitril/5 ml Gel in 20 ml Sodalsng.

eine 15 cm lange, 1 cm dicke, umkehrbare Säule gegossen.

Die Kopplung der Antikörper erfolgte bei 4°C, indem ca. 5 ml Serum, welches nur Antikörper gegen eine Untereinheit enthielt, über Nacht sehr langsam durch das Gel gespült wurden (Durchflußrate 2 ml/Stunde). Nach Elution der Hämoglobinfront wurde mit PBS nachgewaschen. Die Ablösung der hämocyanspezifischen IgG- Moleküle erfolgte bei entgegengesetztem Durchfluß (20 ml/ Stunde) durch eine Reihe von pH- Sprüngen. Nacheinander wurden folgende Puffer verwendet: 15 ml 0,2 M Glycin/HCl, pH 2,8

15 ml 0,2 M Dikaliumhydrogenphosphat-Lösung

15 ml 0,2 M Glycin/HCl, pH 2,2

15 ml 0,2 M Dikaliumhydrogenphosphat-Lösung

Die sauren Fraktionen wurden sofort nach der Elution mit 1 M Dikaliumhydrogenphosphat-Lösung neutralisiert.

Pufferzusammensetzungen:

Bicarbonatpuffer, pH 9,0 bzw 9,7: 2,1 g NaHCO_3 in 700 ml H_2O lösen, mit 1 M Na_2CO_3 pH einstellen, ad 1 L.

Borat/NaCl-Lösung: 47,67 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$ in 900 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung unter Erwärmen lösen, mit HCl pH auf 8,8 einstellen, ad 1 L.

Natriumacetat/NaCl-Lösung: 8,203 g NaAc + 28,72 g NaCl ad 1 L.

Bicarbonat/NaCl-Lösung: in 1 L Bicarbonatpuffer pH 9,7 (s.o.) 28,72 g NaCl lösen.

Harnstoff/NaCl-Lösung: 120 g Harnstoff + 28,72 g NaCl ad 1 L.

PBS (0,1 M, pH 7,4): 72,09 g Na_2HPO_4 + 13,07 g NaH_2PO_4 + 42,5 g NaCl + 3 g NaN_3 ad 5 L.

Glycin/HCl-Puffer, 0,2 M, pH 2,2 bzw 2,8: 1,5 g Glycin ad 100 ml, mit konz. HCl pH einstellen.

1 M Dikaliumhydrogenphosphat-Lösung: 22,823 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3 \text{ H}_2\text{O}$ ad 100 ml.

4. Sauerstoffbindungskurven

Kontinuierliche Sauerstoffbindungskurven wurden nach der Methode von Loewe (1978) gemessen. Dabei wurde in einem Ratio Fluorometer-2 der Firma Farrand die Hämocyandinfluoreszenz bei 350 nm gemessen. Die Sauerstoffelektroden bezog

ich von der Firma Bachofer; sie wurden mit einer 6 μm dicken Teflonmembran überzogen. Das Probenvolumen betrug 500 μl bei Proteinkonzentrationen zwischen 0,005 und 0,18 mg/ml. Die Temperatur betrug in der Regel 20°C. Die Auswertung der Sauerstoffbindungskurven erfolgte mit Hilfe eines Digitalisiertabletts (Summagraphics), das mit einem Tektronix TK 31 Tischrechner verbunden war. Die Programme zur Transformation der Kurven in Hill-Plots, Scatchard/Edsall-Plots und van Holde-Plots wurden von H. Decker ausgearbeitet.

5. Proteinbestimmung und UV Spektren

Proteinkonzentrationen und UV Spektren wurden in einem Photometer der Firma Cary bzw der Firma Perkin Elmer gemessen. Nach Loewe und Linzen (1973) entspricht eine Extinktionseinheit bei 280 nm ca. einem mg Protein/ml.

6. Dialysen, Puffer, Denaturierungen und Proteinkonzentrierung

Dialysen wurden in Visking-Dialysierschläuchen durchgeführt. Standardpuffer waren für die Dissoziation von Hämocyanin Glycin/NaOH-Puffer, $I=0,05$, pH 9,6 (10 g Glycin ad 1 L, pH mit NaOH einstellen), für die Reassoziaton und zur Aufbewahrung von Hämocyanin dienten Tris/HCl-Puffer mit $I=0,1$ und pH 7,5 - 8,0 (12,114 g Tris ad 1L, mit konz. HCl pH einstellen). Für spezielle, in Teil C beschriebene Versuche wurden den Tris/HCl-Puffern verschiedene Reagenzien zugesetzt; für pH- Abhängigkeitsversuche verwendete ich 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 6,0 - 9,0, sowie 0,2 M Acetatpuffer, pH 3,5 - 5,0.

Die Denaturierung von Proteinen für SDS-Gelelektrophoresen erfolgte mit Natriumdodecylsulfat (SDS) nach Weber und Osborn (1969).

Zur Konzentrierung von Proteinlösungen wurden diese gegen eine im gleichen Puffer wie das Protein gesättigte Poly-

äthylenglycol (PEG)-Lösung dialysiert.

7. Zentrifugationen

Kleine Mengen wurden in einer Eppendorf-Tischzentrifuge bei 12000 g abzentrifugiert.

Präparative Ultrazentrifugationen erfolgten in einer Beckmann L2- Zentrifuge in einem Rotor Ti 50.

Analytische Ultrazentrifugationen wurden von W.Stöcker, wie in seiner Doktorarbeit (1984) beschrieben, durchgeführt und ausgewertet. Verwendet wurde eine analytische UZ Modell E der Firma Beckman.

8. Elektronenmikroskopie

Elektronenmikroskopische Aufnahmen wurden von Frau M.M.C. Bijlholt und Frau T.Wichertjes im Labor von Prof. E.F.J. van Bruggen, Rijksuniversiteit Groningen (Holland) durchgeführt. Proteinproben mit einer Konzentration von 1-2 mg/ml wurden auf Kupfernetze mit 60-70 µm starken Kohlefilmen aufgesprüht (spray-droplet technique) und nach Brenner und Horne (1959) unter Verwendung von ungepuffertem 1 %igem Uranylacetat, pH 5,0, negativ kontrastiert (Siezen and van Bruggen 1974). Die Aufnahmen wurden in einem Gerät der Firma Jeol, Typ JEM 100 B untersucht. Die Primärvergrößerung war 60000-fach.

Film: Eastman-Kodak fine grain release positiv film 53002
Platten: Kodak Elektron image plates.

E R G E B N I S S E

A. PARTIELLE DISSOZIATION DES 37 S-HÄMOCYANINS: ZUSAMMENSETZUNG DER DISSOZIATIONSWISCHENSTUFEN AUS UNTEREINHEITEN

Die Aufklärung der Quartärstruktur des 37 S-Moleküls war eine der vordringlichsten Problemstellungen. Einen Beitrag dazu sollte die Untersuchung von Dissoziationszwischenstufen auf ihre Zusammensetzung aus Untereinheiten liefern. Auch für funktionelle Experimente mit Dissoziationszwischenstufen war die Kenntnis des strukturellen Aufbaus eine wesentliche Voraussetzung.

In der Hämolymphe von *Eurypelma californicum* kommt neben dem 37 S-Hämocyanin noch ein 16 S-Begleitprotein vor. Für die folgenden Versuche wurde das 37 S-Hämocyanin mittels Gelfiltration (Biogel A 5m) von den übrigen Hämolymphebestandteilen abgetrennt. Bei mehrtägiger, bei einer Verdünnung auf ca. 1-4 mg/ml nur 24-stündiger Dialyse gegen Glycin/NaOH-Puffer, pH 9,6, $I=0,05$ zerfällt das 37 S-Hämocyanin in seine Untereinheiten. Bei kurzzeitiger Dissoziation oder nach Behandlung mit reduzierenden Reagenzien oder mit Harnstoff entstehen dagegen eine Reihe von Dissoziationszwischenstufen, welche in neutralen und alkalischen PA-Gelen als definierte Banden zwischen der 37 S-Bande und den Banden der Untereinheiten zu erkennen sind (Abb.1). Je nach Wahl des Reagens oder des PA-Gels (alkalisch oder neutral) kann die Ausbeute an bestimmten Zwischenstufen erhöht werden. So treten fünf Dissoziationszwischenstufen, die Zwischenstufen 1,4,5,6 und 7 nach etwa dreistündigem Dissoziieren des 37 S-Hämocyanins in Glycin/NaOH-Puffer, pH 9,6, $I=0,05$ und anschließender Elektrophorese des Dissoziationsgemisches in Gelsystem II, pH 8,4 auf (Abb.4). Trägt man das Dissoziationsgemisch in Gelsystem I, pH 7,5 auf, so erscheinen zwei weitere, als Doppelbande erkennbare Zwischenstufen (2 und 3) und die Zwischenstufe 1 ist viel deutlicher erkennbar und besser

getrennt vom 37 S-Hämocyanin (Abb.4).

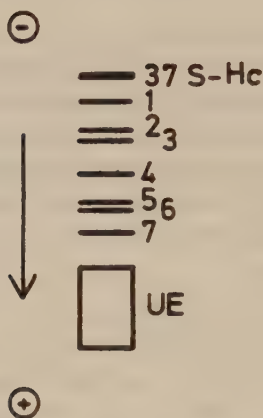


Abbildung 1:
Schematische Darstellung der Dissoziationszwischenstufen
in der Reihenfolge ihres Auftretens in der PAGE.

Eine Spaltung des 37 S-Hämocyanins mit dem reduzierenden Agens β -Mercaptoäthanol und anschließende Auftrennung des Spaltgemisches in Gelsystem I, pH 7,5 führt zu einer deutlich höheren Ausbeute an den Dissoziationszwischenstufen 4 und 6 (Abb.4). P.Nahke fand, daß Zwischenstufe 7 durch 12-stündige Dialyse des 37 S-Hämocyanins gegen einen 4 M Harnstoff enthaltenden 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0 und anschließende Elektrophorese in Gelsystem I, pH 7,5 in großer Menge erhalten werden kann (Abb.4).

Die Isolierung der Zwischenstufen erfolgte stets durch Herausschneiden der Proteinbanden aus einem PA-Gel und anschließende Elution des Proteins aus dem Gel. Andere

Isolierungsmethoden, wie z.B. Gelfiltration oder TLG ergaben in den meisten Fällen keine zufriedenstellenden Trennergebnisse.

Zur Analyse der Untereinheiten in den Dissoziationszwischenstufen wurden die Proteinproben über Nacht in Untereinheiten dissoziiert, einer zweidimensionalen Immunelektrophorese unterworfen, und die Flächen der einzelnen Präzipitatgipfel der Untereinheiten berechnet. Die Quantifizierung der Untereinheiten erfolgte nach folgendem Prinzip: Als Referenz wurde jeweils die noch in genügender Stärke vorhandene 37 S-Hämocyaninbande mit herausgeschnitten (aus dem PA-Gel), in gleicherweise wie die Zwischenstufen dissoziiert, immunelektrophoretisch aufgetrennt und die Flächen unter den einzelnen Gipfeln im prozentualen Verhältnis zur Gesamtfläche berechnet. Ist die Zusammensetzung des 37 S-Hämocyanins bekannt, so können auch die theoretischen prozentualen Anteile der einzelnen Untereinheiten im Präzipitatomuster berechnet werden. Da jedoch die Reaktion der Antiseren mit den verschiedenen Untereinheiten unterschiedlich stark ist, weichen die tatsächlichen prozentualen Flächen unter den Präzipitatgipfeln der Untereinheiten von theoretisch in ganzzahligen Verhältnissen stehenden Flächen ab. Ich berechnete, wieviel Prozent die tatsächliche Gipfelfläche jeder Untereinheit von der theoretischen Fläche ausmacht. Diese Zahlen dienten als Korrekturfaktoren, mit denen die Flächen unter den Präzipitatgipfeln korrigiert wurden. Aus dem Verhältnis der korrigierten Flächen wurde die Anzahl der Untereinheiten berechnet. Wie die Gesamtuntereinheitenzahl jeder Zwischenstufe bestimmt wird, ist unten beschrieben.

1. Zusammensetzung des 37 S-Hämocyanins aus Untereinheiten

Wie in der Einleitung beschrieben, war zu Beginn dieser Arbeit bekannt, daß sich die sieben Untereinheiten wie

Tabelle 1:

Verhältnis der Gipfelflächen von a:g in der zweidimensionalen Immunelektrophorese. Bedingungen siehe Abb. 2.

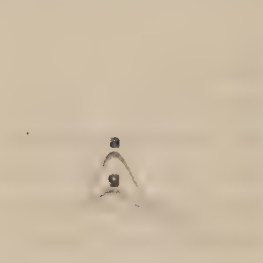
	UE	Fläche	Verhältnis a:g
UE a	a	0,626	1,69
UE g	g	0,371	
UE a+g	a	0,404	1,87
	g	0,212	
37 S-Dissoziat	a	0,623	1,76
	g	0,354	



a



b



c



d

Abbildung 2:

Flächenverhältnisse der Untereinheiten a zu g in der zweidimensionalen Immunelektrophorese. 1.Dimension: a) isolierte Untereinheit a, 8,2 μ l, $E_{280}=0,122$; b) isolierte Untereinheit g, 6,6 μ l $E_{280}=0,151$; c) isolierte Untereinheiten a+g 8,2 μ l+6,6 μ l $E_{280}=0,122$ bzw. 0,151; d) 37 S-Dissoziat 5 μ l $E_{280}=0,38$. 2.Dimension: je 100 μ l Antiserum gegen 37 S-Dissoziat.

folgt auf ein 37 S-Molekül, das bedeutet auf ein 24-mer verteilen: $8 a + g + 2 b + 2 c + 4 d + 4 e + 4 f$ (Markl et al., 1980). Auf Grund des deutlich höheren Gipfels der Untereinheit a gegenüber der Untereinheit g in der zweidimensionalen Immunelektrophorese und auf Grund der Proteinbandenstärke bei der PAGE nach alkalischer Dissoziation wurde ein Verhältnis $a:g = 6:2$ angenommen. Um das tatsächliche Verhältnis der Untereinheiten a:g zu erhalten, setzte ich gleiche Mengen (Extinktion bei 280 nm) der gereinigten Untereinheiten a und g sowohl einzeln als auch miteinander in der zweidimensionalen Immunelektrophorese ein. Das Agarosegel der zweiten Dimension enthielt Antikörper gegen 37 S-Dissoziat. Die Flächen der Präzipitatzipfel entsprachen den Flächenverhältnissen im 37 S-Dissoziat (Tab.1, Abb.2). Daraus ist zu schließen, daß im 37 S-Molekül die Untereinheiten a und g im gleichen Verhältnis, nämlich $4 a : 4 g$ vorliegen. Somit ist das Untereinheitenverhältnis im 37 S-Hämocyanin:

$$a:b:c:d:e:f:g = 4:2:2:4:4:4:4$$

2. Bestimmung der Untereinheitenanzahl in den Dissoziationszwischenstufen

Die Anzahl der Untereinheiten in einer Reihe von Dissoziationszwischenstufen wurde durch elektrophoretischen Vergleich mit bekannten Hämocyaninen anderer Tiere oder mit bekannten Untereinheitenaggregaten, zum Beispiel Reassoziaten, bestimmt (Tab.2). Dissoziationszwischenstufe 1 entspricht demnach einem 19-mer. Das entspricht wahrscheinlich der 30 S-Komponente von Decker (1981). Dissoziationszwischenstufe 4 entspricht einem Dodekamer bzw. einer 24 S-Komponente, Zwischenstufe 6 entspricht einem Heptamer bzw. einer 18 S-Komponente, und Zwischenstufe 7 entspricht einem Hexamer bzw. einer 16 S-Komponente (Tab.2). Die Untereinheitenzahl der als Doppelbande auftretenden Zwischen-

stufen 2 und 3 und der als zweite "18 S-Bande" auftreten-
den Zwischenstufe 5 wurden nach Ferguson (1964) bestimmt.
Dabei wurden die bereits bekannten Zwischenstufen als Eich-
substanzen verwendet (Abb.3).

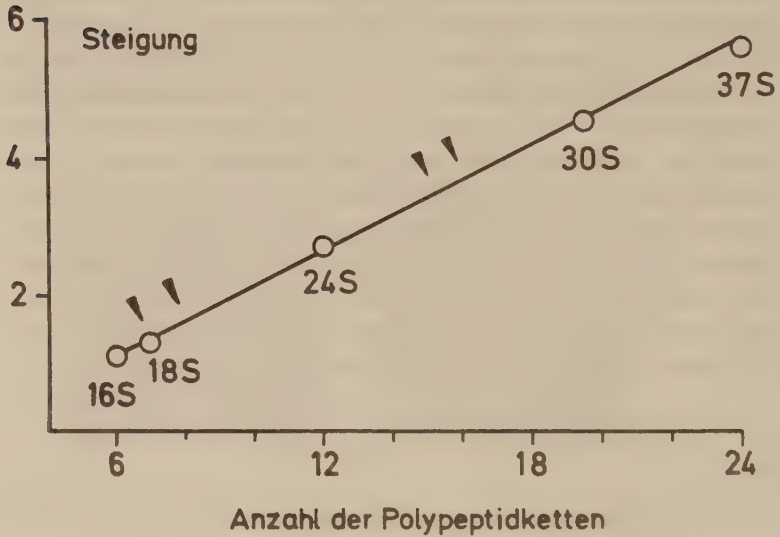


Abbildung 3:

Elektrophoretische Bestimmung der Anzahl an Untereinheiten nach Ferguson (1964) in vier Dissoziationszwischenstufen (Pfeile) des Eurypelma-37 S-Hämocyanins: in der "Doppelbande" und in den beiden 18 S-Banden. Die Zwischenstufen 16 S, 24 S, 30 S und das 37 S-Hämocyanin von Eurypelma californicum sowie die 18 S-Komponente von Cupiennius saelei wurden als Standards verwendet.

Die "Doppelbandenkomponenten" bestehen danach aus 15 und 16 Untereinheiten; sie entsprechen wahrscheinlich einer früher beschriebenen 27 S-Komponente (Loewe und Linzen 1973). Die zweite 18 S-Bande wurde als Oktamer bestimmt.

Tabelle 2:

Anzahl der Untereinheiten und wahrscheinliche S-Werte
der einzelnen Dissoziationszwischenstufen

Zwischenstufe in der PAGE	Methode zur Bestimmung der UE-Zahl	UE-Zahl	S-Wert
37 S-Hc		24	37
1	*Vergleich mit Eurypelmahämocyanin-Reassoziaten in Gelsystem I (Decker 1981)	19	30
2	Ferguson	16	27
3	Ferguson	15	
4	Vergleich mit Cupiennius-hämocyanin (24 S) in Gelsystem II (Markl 1980) Vergleich mit * s.o.	12	24
5	Ferguson	8	18
6	Vergleich mit Cupiennius-hämocyanin (18 S) in Gelsystem II (Markl 1980) Vergleich mit * s.o.	7	
7	Vergleich mit Cupiennius-hämocyanin (16 S) in Gelsystem II (Markl 1980) Vergleich mit * s.o.	6	16

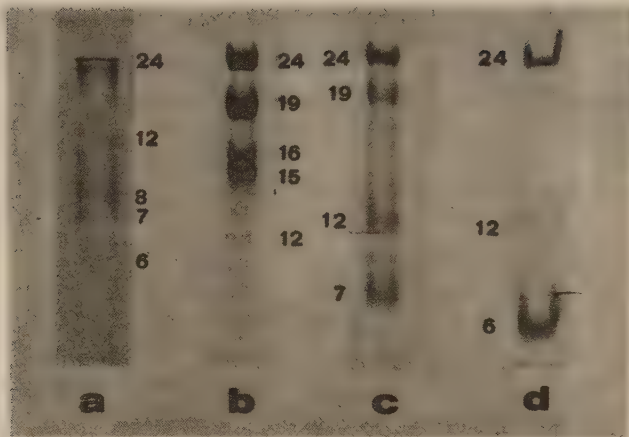


Abbildung 4:

PAGE der verschiedenen Dissoziationszwischenstufen des 37 S-Hämocyanins. Angegeben ist die Anzahl der Untereinheiten für jede Zwischenstufe (24-mer = 37 S, 19-mer = 30 S, 15/16-mer = 27 S, Dodekamer = 24 S, Hepta-/Oktamer = 18 S, Hexamer = 16 S). Pro Elektrophorese wurden a) ca. 10-12 µg, b-d) ca. 20-40 µg Protein eingesetzt.

a) dreistündige Dialyse des 37 S-Hämocyanins bei Raumtemperatur gegen Glycin/NaOH-Puffer, pH 9,6, I=0,05; Elektrophorese in Gelsystem II, pH 8,4. Dominierende Produkte: 24-mer, Oktamer, Heptamer.

b) Bedingungen wie a); Elektrophorese in Gelsystem I, pH 7,5; dominierende Produkte: 24-mer, 19-mer, 16-mer, 15-mer.

c) Spaltung des 37 S-Hämocyanins bei 37°C 1/2 Stunde in 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,5 + 5% β-Mercaptoäthanol; Elektrophorese in Gelsystem I, pH 7,5; dominierende Produkte: 24-mer, 19-mer, Dodekamer, Heptamer.

d) Dialyse des 37 S-Hämocyanins über Nacht bei Raumtemperatur gegen 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,5 + 4M Harnstoff; Elektrophorese in Gelsystem I, pH 7,5; dominierende Produkte: 24-mer, Hexamer.

19-mer=1; 16-mer=2; 15-mer=3; 12-mer=4; 8-mer=5; 7-mer=6
6-mer=7 der Abbildung 1.

3. Zusammensetzung des 19-mers, des 16-mers und des Heptamers aus Untereinheiten - Kurzzeitdissoziation des 37 S-Hämocyanins

a) Das 19-mer und das 16-mer

Das 19-mer und das 16-mer können mit guter Ausbeute nach kurzzeitiger Dissoziation (Glycin/NaOH-Puffer, pH 9,6, $I=0,05$) aus einem neutralen PA-Gel (System I, pH 7,5) isoliert werden. Wie eine Dissoziationskinetik zeigt, in der 37 S-Hämocyanin (6 mg/ml) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 und 24 Stunden lang bei pH 9,6 inkubiert wurde, sind nach zweistündiger Inkubation das 19-mer und das 16-mer deutlich sichtbar, ohne daß das Hämocyanin all zusehr in Untereinheiten zerfallen ist (Abb.5).

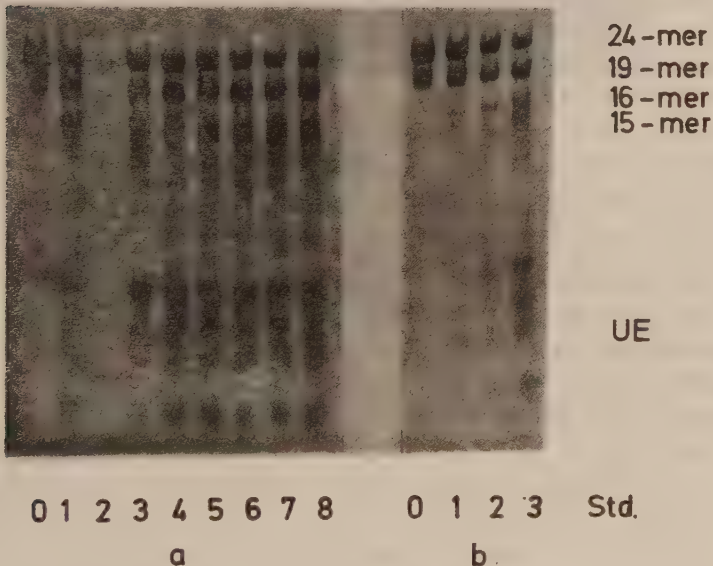


Abbildung 5:
PAGE in Gelsystem I, pH 7,5 einer Dissoziationskinetik des 37 S-Hämocyanins. 37 S-Hämocyanin wurde 0,1,2,3,4,5, 6,7 und 8 Stunden gegen Glycin/NaOH-Puffer, pH 9,6, $I=0,05$ dialysiert. Die Dialysezeit ist in Stunden angegeben. Aufgetragen wurden in a) 40 µg Protein, in b) 20 µg Protein.

Nach dreistündiger Inkubation tritt zusätzlich das 15-mer auf. Bei der relativ hohen Konzentration von 6 mg/ml zerfällt das Hämocyanin auch nach 24-stündiger Dialyse gegen Dissoziationspuffer nicht vollständig in seine Untereinheiten.

Das 19-mer und das 16-mer, sowie als Referenz das 24-mer wurden aus dem PA-Gel herausgeschnitten und eluiert, während das 15-mer nicht isoliert werden konnte (Abb.6a).

Abb. 6b zeigt die immunoelektrophoretischen Muster der drei Komponenten nach Dissoziation in Untereinheiten. Deutlich sichtbar ist ein Anwachsen des bc-Gipfels vom 24-mer über das 19-mer zum 16-mer, und ein Anwachsen des d-Gipfels beim 16-mer. Die Berechnung der Untereinheitenzusammensetzung ergab für das 19-mer: 3 a, 4 bc, 3 d, 3 e, 3 f und 3 g (Tab. 3 und 4). Das bedeutet, daß je eine der Untereinheiten a, d, e, f und g aus dem 37 S-Molekül gebrochen sind. In elektronenmikroskopischen Bildern (Tab. 8) von gealtertem oder kurz dissoziiertem 37 S-Hämocyanin sind oft Strukturen zu sehen, die aus drei Hexameren bestehen mit einer zusätzlichen Untereinheit, die in den Bereich des vierten Hexamers ragt. Diese Strukturen stellen wahrscheinlich die 19-mer Zwischenstufe dar.

Das 16-mer setzt sich aus den Untereinheiten 3 a, 4 bc, 3 d, 2 e, 2 f und 2 g zusammen (Tab. 3) Es werden also außer den fünf Monomeren, die dem 19-mer fehlen, noch die Untereinheiten e, g und f abgespalten.

Der relativ hohe Wert von 3,3 für Untereinheit a (Tab. 3) im 19-mer ließe sich damit erklären, daß bei der Isolierung des 19-mers eventuell in geringer Menge ein 20-mer mitisoliert wurde, das zusätzlich die Untereinheit a besitzt:

Tabelle 3:

Zusammensetzung des 19-mers und des 16-mers aus Untereinheiten (Mittelwerte aus je zwei Versuchen)

UE	a	bc	d	e	f	g
19-mer	3,3	3,9	3,0	2,8	3,0	2,9
16-mer	3,0	3,7	2,9	2,0	1,9	2,0

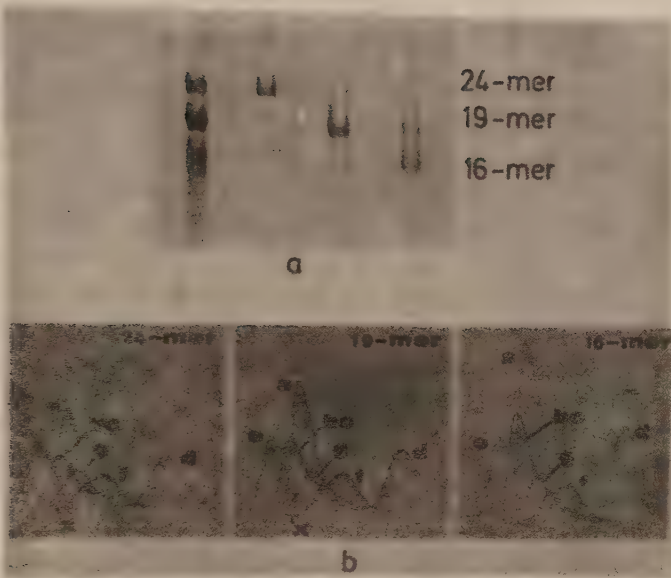


Abbildung 6:

a) PAGE in Gelsystem I, pH 7,5, der isolierten Zwischenstufen 24-mer, 19-mer, 16-mer. Die Referenzprobe (links) ist ein Dissoziationsgemisch nach 8-stündiger Dialyse von 37 S-Hämocyanin gegen Glycin/NaOH-Puffer, pH 9,6. Aufgetragene Proteinmenge ca. 40 µg. Die Konzentrationen der isolierten Zwischenstufen sind unbekannt^x).

b) Zweidimensionale Immunelektrophorese nach vollständiger Dissoziation der Zwischenstufen 19-mer und 16-mer sowie als Referenz des 24-meren nativen Hämocyanins. 4 µg Protein wurden für die erste Dimension eingesetzt. Das Agarosegel für die 2. Dimension enthielt je 100 µl Antiserum gegen 37 S-Dissoziat.

x) Eine Proteinkonzentrationsbestimmung der aus PA-Gelen isolierten Proteinbanden war durch Messung der optischen Dichte bei 280 nm oder bei 340 nm nicht möglich, da sich vorhandene Gelpartikel als störend erwiesen. Aus der Intensität der Proteinbanden im PA-Gel bzw. aus der Gipfelhöhe des Dissoziationsmusters in der Immunelektrophorese konnten die Proteinkonzentrationen ungefähr abgeschätzt werden. Eine genauere Bestimmung erwies sich als unnötig.

Tabelle 4:
Beispiel für die Berechnung der Untereinheitenanzahl am 19-mer

Untereinheiten	a	bc	d	e	f	g	Gesamtfläche bzw. UE-Zahl
<u>Referenzgel (24-mer)</u>							
UE-Fläche in cm^2	0,96	0,52	0,65	0,63	0,46	0,42	3,64
UE-Fläche in % = A	26,4	14,3	17,9	17,3	12,6	11,5	100
Anzahl der UE	4	4	4	4	4	4	24
theoretische UE-Fläche (%) = B	16,67	16,67	16,67	16,67	16,67	16,67	100
Korrekturfaktor A/B x 100 (%)	158	86	107	104	76	69	
<u>19-mer-Gel</u>							
UE-Fläche in cm^2	1,35	0,86	0,79	0,76	0,56	0,51	4,83
UE-Fläche in % = A'	27,9	17,8	10,4	15,7	11,6	10,6	100
100xA'/Korrekturfaktor	17,7	20,7	15,3	15,1	15,3	15,3	
Anzahl der UE	3,4	3,9	2,9	2,9	2,9	2,9	
abgerundete Zahl	3	4	3	3	3	3	19

b) Das Heptamer

Nach etwa dreistündigem Dissoziieren von 37 S-Hämocyanin (6,7 mg/ml) tritt das Heptamer zusammen mit einem Oktamer im Gelsystem II, pH 8,5 als Doppelbande im 18 S-Bereich auf. Präparativ konnte nur eine Proteinbande isoliert werden, und zwar das Heptamer. Abb. 7a zeigt ein präparatives PA-Gel, aus dem das 24-mer und das Heptamer herausgeschnitten wurden. Die Untersuchung der isolierten Proteinbanden im Gelsystem II, pH 8,4 zeigt, daß es sich bei der 18 S-Komponente tatsächlich um das Heptamer handelt, das nur geringfügig mit dem Oktamer verunreinigt ist. Das Oktamer konnte nicht isoliert werden (Abb. 7b).

Die immunoelektrophoretische Auftrennung des dissoziierten 24-mers und des Heptamers ergibt einen deutlich größeren bc-Gipfel für das Heptamer (Abb. 7c). Die Berechnung der Untereinheitenzusammensetzung im Heptamer ergab, daß alle sieben Untereinheiten einmal vorhanden sind: 1 a, 2 bc, 1 d, 1 e, 1 f und 1 g (Tab. 5). Das Heptamer würde damit ein Hexamer mit einer zusätzlichen Untereinheit des Dimers bc darstellen. In elektronenmikroskopischen Bildern (Tab. 8) sind in der Tat solche Strukturen zu erkennen. Um die Vermutung zu überprüfen, daß es sich bei der siebten Untereinheit um einen Teil des Heterodimers bc handelt, versuchte ich, das Heptamer mit 4 M Harnstoff zu behandeln. Das Dimer bc kann nämlich mit 4 M Harnstoff in die Monomeren b und c zerlegt werden (Schneider 1978). In einem Versuch gelang es mit dieser Methode aus Heptameren in geringer Menge Hexamere herzustellen, die abgespaltene Untereinheit konnte jedoch nicht identifiziert werden. Der etwas höhere Wert für die Untereinheit d in Tabelle 5 ließe sich durch eine Verunreinigung des Heptamers mit Oktamer erklären, wenn das Oktamer die Untereinheit d zweimal besitzen würde.

Tabelle 5:
Zusammensetzung des Heptamers aus Untereinheiten (Mittelwerte aus zwei Versuchen)

UE	a	bc	d	e	f	g
7-mer	1,0	1,8	1,2	1,0	1,1	0,9

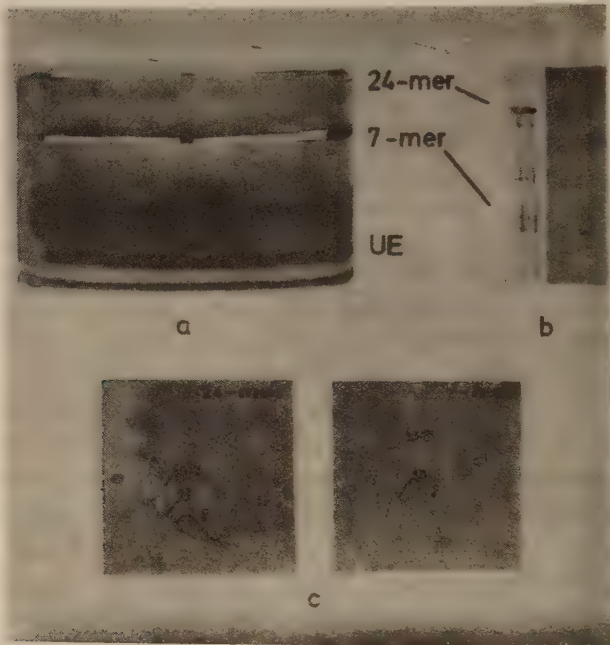


Abbildung 7:

a) Angefärbtes PA-Gel (System II, pH 8,4) einer präparativen Isolierung. Die Proteinbanden des 24-mers und des Heptamers wurden vor der Färbung herausgeschnitten. Als Marker dienten angefärbte Gelstreifen rechts, links und in der Mitte. 2,7 mg 37 S-Hämocyanin wurde 3 Stunden dissoziiert und dann auf die gesamte Geloberfläche aufgetragen.

b) PAGE des isolierten Heptamers und des 24-mers in Gel-System II, pH 8,4. Als Referenz (links) diente ein Dissoziationsgemisch, nach dem 37 S-Hämocyanin 3 Stunden dissoziiert worden war. Aufgetragen wurden je ca. 3 µg Protein.

c) Zweidimensionale Immunelektrophorese des dissoziierten 24-mers und des Heptamers. 1. Dimension: 4 µg Protein, 2. Dimension: 100 µl Antiserum gegen 37 S-Dissoziat.

4. Zusammensetzung des Dodekamers und des Heptamers aus Untereinheiten - Spaltung mit reduzierenden Reagenzien

Behandelt man 37 S-Hämocyanin (3-5 mg/ml) mit dem reduzierenden Agens β -Mercaptoäthanol, so erhält man im Gelsystem I, pH 7,5 deutliche Proteinbanden, die einem Dodekamer und einem Heptamer entsprechen. Das schon bekannte 19-mer wird ebenfalls gebildet. Aus Spaltversuchen mit verschiedenen β -Mercaptoäthanol-Konzentrationen und aus einer Spaltungskinetik ist zu entnehmen, daß sich bei einer Temperatur von 37°C und einer 30-minütigen Spaltung in 5% β -Mercaptoäthanol enthaltenden 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0 eine optimale Ausbeute an Dodekamer und Heptamer ergibt, ohne daß das Hämocyanin zu sehr in Untereinheiten zerfallen ist (Abb.8).

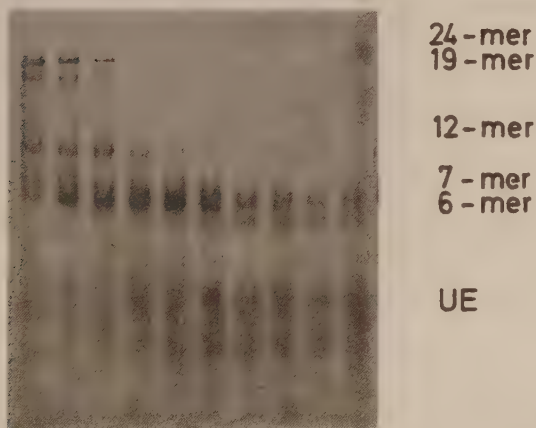


Abbildung 8:
PAGE in Gelsystem I, pH 7,5, einer Spaltungskinetik von 37 S-Hämocyanin (3mg/ml) in einem 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0 + 5% β -Mercaptoäthanol bei 37°C. Spaltdauer von links nach rechts: 0,08, 0,15, 0,3, 0,5, 0,7, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0 und 6,0 Stunden. Aufgetragene Proteinmenge je ca. 30 μ g.

Nach etwa dreistündiger Spaltung tritt eine hexamere Komponente auf, wobei das Dodekamer verschwindet, und das Hämocyanin weitgehend in Untereinheiten zerfallen ist. Die Spaltung funktioniert gleichermaßen in einem 40 mM DTT enthaltenden 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0, nicht aber mit Glutathion oder mit Cystein. Die Isolierung des Dodekamers und des Heptamers sowie des 24-mers als Referenz erfolgte aus Gelsystem I, pH 7,5 (Abb. 9a). Während das Heptamer sehr stabil ist, scheint das Dodekamer nach der Isolierung zum Teil zum 24-mer zu reassoziieren.

Die Berechnung der Zusammensetzung aus Untereinheiten auf Grund der Präzipitatgipfel in der zweidimensionalen Immunelektrophorese (Abb. 9b) ergab für das Dodekamer die gleiche Zusammensetzung wie für das 24-mer. Das bedeutet, das Dodekamer stellt das Halbmolekül dar mit den Untereinheiten 2 a, 2 bc, 2 d, 2 e, 2 f und 2 g (Tab. 6).

Die Zusammensetzung des Heptamers aus Untereinheiten entspricht den Ergebnissen, die für das Heptamer nach Kurzzeitdissoziation des 37 S-Hämocyanins erhalten wurden: 1 a, 2 bc, 1 d, 1 e, 1 f und 1 g (Tab. 6).

Da β -Mercaptoäthanol inter- und intramolekulare Disulfidbrücken spaltet, kann die Antigen-Antikörperreaktion einzelner Untereinheiten verändert sein. Die Unterschiede bei den Präzipitatgipfeln der Untereinheiten zwischen 37 S-Dissoziat und 37 S-Dissoziat nach β -Mercaptoäthanolbehandlung sind damit erklärbar (Abb. 9b).

Tabelle 6:

Spaltung mit β -Mercaptoäthanol (1/2 Std. bei 37°C)
Zusammensetzung des Dodekamers und des Heptamers aus Untereinheiten (Mittelwerte aus zwei Versuchen)

UE	a	bc	d	e	f	g
12-mer	1,9	2,2	1,7	2,1	1,9	2,0
7-mer	1,1	1,9	1,2	0,9	0,9	1,1

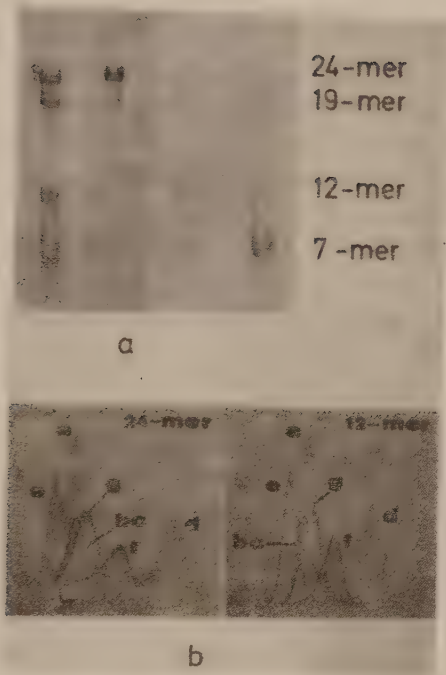


Abbildung 9:

a) PAGE in Gelsystem I, pH 7,5 des isolierten 24-mers, des Dodekamers und des Heptamers. Referenz (links) ist ein Spaltgemisch, nach dem 37 S-Hämocyanin 1/2 Stunde bei 37°C in einem 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0 + 5% β -Mercaptoäthanol incubiert wurde. Aufgetragene Proteinmenge ca. 30 μ g.

b) Zweidimensionale Immunelektrophorese des dissoziierten 24-mers und des Dodekamers. 1.Dimension: 4 μ g Protein, 2.Dimension 100 μ l Antiserum gegen 37 S-Dissoziat.

5. Zusammensetzung des Hexamers aus Untereinheiten - Spaltung mit 4 M Harnstoff

Nach Behandlung des 37 S-Hämocyanins mit 4 M Harnstoff tritt im Gelsystem I, pH 7,5 sowie im Gelsystem II, pH 8,4 eine Bande im 16 S-Bereich auf, die einem Hexamer entspricht. Es ist bekannt, daß Harnstoff das Heterodimer bc in die Monomeren b und c spaltet (Schneider 1978). Bei einer Dialyse von 37 S-Hämocyanin (4-6 mg/ml) über Nacht gegen einen 0, 2, 4, 6 oder 8 M Harnstoff enthaltenden 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0 erwies sich 4 M Harnstoff als optimale Konzentration. 2 M Harnstoff führte nur in sehr geringer Menge zu einer hexameren Zwischenstufe, während 6 M Harnstoff das Hämocyanin völlig in Untereinheiten zerlegte, bzw. stark denaturierte (Abb. 10).



24-mer

6-mer

Abbildung 10:

PAGE in Gelsystem I, pH 7,5 von 37 S-Hämocyanin, das über Nacht bei Raumtemperatur gegen 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0 + (von links nach rechts) 0,2,4,6,8 M Harnstoff dialysiert wurde. Aufgetragene Proteinmenge ca 20 µg pro Bahn.

Das Hexamer und als Referenz das 24-mer wurden aus PA-Gelelen (System I, pH 7,5) isoliert, über Nacht in Untereinheiten dissoziiert und die Untereinheiten in der zweidimensionalen Immunelektrophorese aufgetrennt (Abb. 12b). Alle Untereinheiten sind im gleichen Verhältnis vorhanden wie im 24-mer, nur mit dem bc-Gipfel ist eine Veränderung vor sich gegangen. Da vermutet wird, daß das Dimer bc als Verbindung zwischen den Hexameren fungiert (Markl et al., 1981), würde man bei der Spaltung des 37 S-Hämocyanins in Hexamere zwei Typen erwarten: Hexamere, die die Untereinheit b enthalten und Hexamere mit Untereinheit c. Überraschenderweise fand ich im Dissoziat des isolierten Hexamers nur Untereinheit b, welche durch den neuen, an Stelle von bc auftretenden Gipfel in der Immunelektrophorese repräsentiert wird (Abb. 12a). Um zu beweisen, daß Untereinheit c im Dissoziat der Hexamere nicht vorhanden ist, führte ich folgende Versuche durch: Hexamerdissoziat wurde mittels Rocket-Immunelektrophorese mit spezifischen Antisera gegen Untereinheit b oder c getestet. Nur mit Antiserum gegen Untereinheit b war ein Präzipitat sichtbar. Als Kontrollversuch wurde 37 S-Hämocyanin über Nacht gegen 4 M Harnstoff enthaltenden 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0, dialysiert, dann gegen 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0; anschließend wurde es dissoziiert. Nun waren beide Bestandteile des Dimers bc in der Rocket-Immunelektrophorese sichtbar. In einer weiteren Versuchsreihe testete ich Hexamerdissoziat mittels "Crossed-Line-Immunelektrophorese", wobei sich entweder Untereinheit b oder c in der Line befand. Wiederum konnte nur Untereinheit b identifiziert werden, während bei einem wie oben beschriebenen Kontrollversuch die Untereinheiten b und c vorhanden waren (Abb. 11).

Für die Quantifizierung der Untereinheiten mußte der b-Gipfel ausgeklammert werden, da die Stärke der Antigen-Antikörperreaktion nicht bekannt war. Die fünf Monomeren kommen im Hexamer je einmal vor: 1 a, 1 d, 1 e, 1 f und 1 g (Tab. 7). Daraus folgt, daß Untereinheit b auch nur

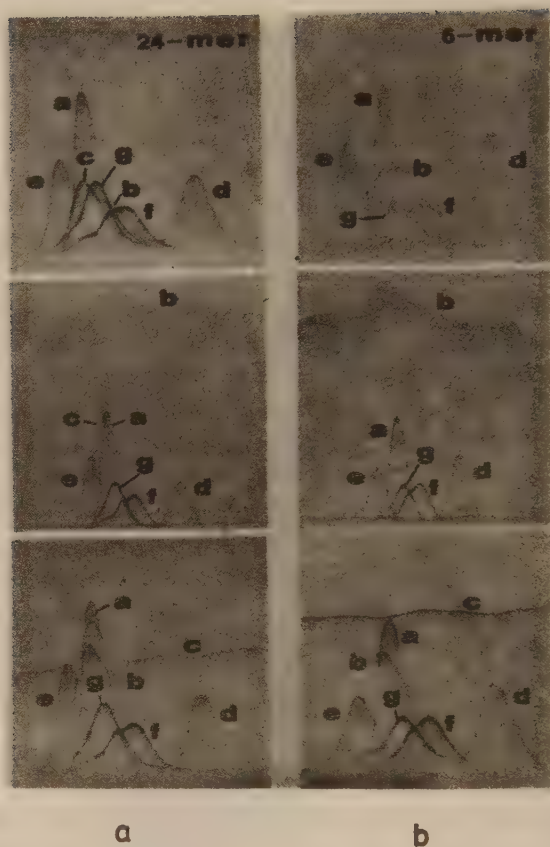


Abbildung 11:

Untereinheitenmuster des mit 4 M Harnstoff behandelten 24-mers und des nach 4 M Harnstoff-Behandlung isolierten Hexamers in der Crossed- (oben) und der Crossed-Line- (mitte und unten) Immunelektrophorese nach Weeke. 1.Dimension: 4 μ g Protein, Line: 12 μ g Protein, 2.Dimension: 100 μ l Antiserum gegen 37 S-Dissoziat.

a) 37 S-Hämocyanin wurde über Nacht bei Raumtemperatur gegen einen 4 M Harnstoff enthaltenden 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0, dialysiert. Das Heterodimer bc wird in die Monomeren b und c gespalten. Nach Entfernung des Harnstoffs mittels Dialyse gegen 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0, wurde das Hämocyanin in Untereinheiten dissoziiert. Die Anwesenheit von b und c wurde durch die Crossed-Line-Versuche entweder mit b oder c in der Line gezeigt (mitte und unten).

b) Nach Dialyse von 37 S-Hämocyanin gegen 4 M Harnstoff enthaltenden Puffer (wie bei a) wurde das Hexamer isoliert. Es enthält nur Untereinheit b, wie die Crossed-Line-Versuche mit b oder c in der Line zeigen (mitte und unten).

Tabelle 7:

Zusammensetzung des Hexamers aus Untereinheiten

UE	a	b	c	d	e	f	g
6-mer	0,9	1,0 ^{a)}	0	1,1	0,9	1,1	1,0

a) per definitionem

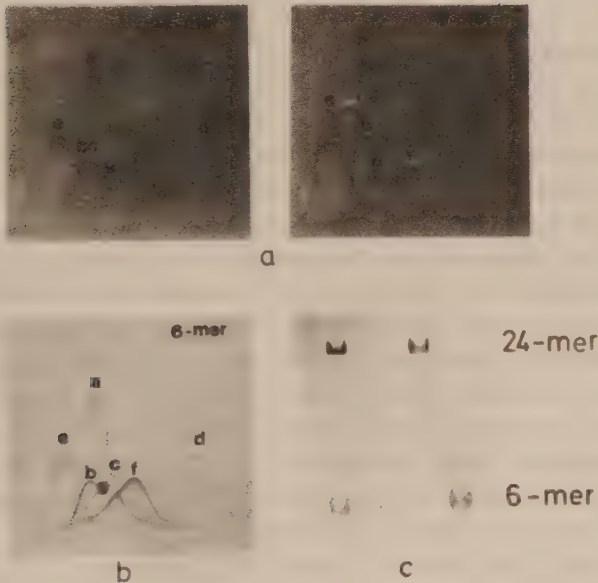


Abbildung 12:

a) Immunelektrophoresemuster des aus einem PA-Gel isolierten und dissoziierten 24-mers und Hexamers in der zweidimensionalen Immunelektrophorese. 1.Dimension: 4 µg Protein, 2. Dimension: 100 µl Antikörper gegen 37 S-Dissoziat.

b) Immunelektrophoresemuster des nach Gelfiltration isolierten Hexamers. Bedingungen wie a).

c) PAGE in Gelsystem I, pH 7,5, des isolierten 24-mers und des Hexamers. Als Referenz (links) wurde 37 S-Hämocyanin (6 mg/ml) über Nacht bei Raumtemperatur gegen 4 M Harnstoff enthaltenden 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0, dialysiert. Aufgetragene Proteinmenge ca. 20 µg.

einmal im Hexamer vorhanden ist.

Isoliert man das Hexamer mittels Gelfiltration über eine Biogel A 5m Säule (siehe Seite 48), so findet man im Dissoziat beide Bestandteile des Dimers bc. Daraus ist zu schließen, daß im nativen 37 S-Hämocyanin beide Arten von Hexameren vorkommen: Hexamere mit Untereinheit b, die stabil sind, und Hexamere mit Untereinheit c, die instabil sind und in der PAGE in Untereinheiten zerfallen.

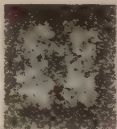
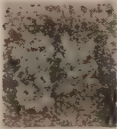
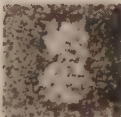
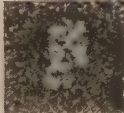
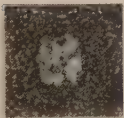
6. Zusammenfassung

Die verschiedenen Untereinheiten sind bis auf das Dimer bc gleichmäßig auf die vier Hexamere verteilt. Das bedeutet, daß das 37 S-Molekül symmetrisch aufgebaut ist. Auffallend ist die Tatsache, daß die symmetrischen Dissoziationszwischenstufen, wie Dodekamer und Hexamer nur nach Behandlung mit relativ aggressiven Reagenzien, wie Harnstoff und β -Mercapto-äthanol hergestellt werden können, während die unsymmetrischen Zwischenstufen, wie das 19-mer, das 15- und 16-mer sowie das Heptamer doch sehr leicht nach Kurzzeitdissoziation entstehen. Am Anfang der Dissoziation brechen die Untereinheiten offenbar nicht wahllos an verschiedenen Seiten des Moleküls heraus, sondern ein Hexamer wird schlagartig bis auf einen Teil der dimeren Untereinheit bc abgebaut. Nur so kann das 19-mer erklärt werden. Die Bedeutung dieser Dissoziationsweise, sowie die Bedeutung der Spaltreagenzien für Rückschlüsse auf die Quartärstruktur oder auf ein Dissoziationsschema wird unten diskutiert.

In Tabelle 8 sind die Ergebnisse für die Zusammensetzung der Dissoziationszwischenstufen aus Untereinheiten nochmals zusammengestellt.

Tabelle 8:

Zusammensetzung der verschiedenen Dissoziationszwischenstufen des 37 S-Hämocyanins aus Untereinheiten. Die EM-Bilder wurden im Labor von Prof. Dr. E. van Bruggen, Universität Groningen, hergestellt.

Zwischenstufe	EM-Bild	Schema	Zusammensetzung aus UE						
			a	b	c	d	e	f	g
24-mer(37 S)			4	2	2	4	4	4	4
19-mer(30 S)			3	2	2	3	3	3	3
16-mer(27 S)			3	2	2	3	2	2	2
12-mer(24 S)			2	1	1	2	2	2	2
7-mer(18 S)			1	1	1	1	1	1	1
6-mer(16 S)			1	$\frac{1}{0}$	$\frac{0}{1}$	1	1	1	1

B. UNTERSUCHUNGEN DER DISSOZIATIONSWISCHENSTUFEN AUF IHRE SAUERSTOFFBINDUNGSEIGENSCHAFTEN

Neben der Quartärstruktur des 37 S-Hämocyanins ist die Frage nach der Funktion dieses großen Moleküls sehr interessant. Wieviele Untereinheiten treten miteinander in Wechselwirkung, um die hohe Kooperativität des 37 S-Hämocyanins zu erreichen? Gehen bei der Sauerstoffbeladung alle 24 Untereinheiten konzertiert vom unbeladenen in den beladenen Zustand über, oder gibt es nur auf der Ebene kleinerer Aggregate, z.B. von Hexameren oder Dodekameren einen konzertierten Übergang? Die Beladung des ganzen Moleküls könnte dann schrittweise über die vier Hexamere bzw. über die beiden Dodekamere vor sich gehen.

Da vom strukturellen Aufbau des 37 S-Moleküls her die Verbindung zwischen den beiden Dodekameren nur sehr schwach zu sein scheint, hat vielleicht die Zusammenlagerung von zwei Dodekameren funktionell keine Bedeutung; dann könnte das Halbmolekül bereits die gleichen funktionellen Eigenschaften besitzen wie das 37 S-Hämocyanin. Mit den strukturell gut charakterisierten Dissoziationszwischenstufen bot sich eine Möglichkeit, in die Problematik der Funktion vorzudringen. Die vier wichtigsten Zwischenstufen, das 19-mer, das Dodekamer, das Heptamer und das Hexamer sollten im Vergleich zum 37 S-Hämocyanin auf ihre charakteristischen Eigenschaften bei der Sauerstoffbindung untersucht werden.

Jede Zwischenstufe war aus einem besonderen Grund interessant: das Hexamer als kleinste Zwischenstufe, die alle monomeren Untereinheiten einmal besitzt und je einen monomeren Bestandteil des Heterodimers bc; das Heptamer, weil es zusätzlich zu allen Monomeren das Heterodimer bc besitzt; das Dodekamer als Halbmolekül, das nach Berechnungen von Decker (1981) ($N=8,6$) die allosterische Einheit darstellen könnte; und schließlich das 19-mer, dem nur fünf Monomere fehlen.

Die Sauerstoffbindungskurven wurden nach der Methode von Loewe (1978) fluorometrisch gemessen. Die charakteristischen Parameter wie der Halbsättigungsdruck p_{50} als Maß für die Affinität zu Sauerstoff, die Kooperativität bei Halbsättigung, n_{50} , und die maximale Kooperativität, $n_{\max}$, wurden nach Transformation der Sauerstoffbindungskurven in ein Hill-Diagramm bestimmt. Das Hill-Diagramm ist eine doppelt logarithmische Auftragung: $\log y/1-y$ gegen $\log p_{O_2}$ (Abb. 13). Die Transformation erfolgt gemäß der Hill-Gleichung: $\log y/1-y = \log K + \log p_{O_2}$. Darin ist y der Anteil des mit Sauerstoff beladenen, $1-y$ der Anteil des unbeladenen Hämocyanins. Bei sehr hoher und sehr niedriger Sauerstoffbeladung können an die transformierte Kurve Asymptoten mit der Steigung $n=1$ angelegt werden. Die Schnittpunkte dieser Asymptoten mit der Abszisse geben die "intrinsischen" Dissoziationskonstanten für den ersten ($\log K_{T,diss}$) und für den letzten ($\log K_{R,diss}$) Beladungsschritt an. Diese Konstanten können auch aus einem nach Edsall et al. (1954) modifizierten Scatchard-Diagramm gewonnen werden. In diesem Diagramm wird $\log Q = \log y/1-y - \log p_{O_2}$ gegen die Anzahl der Bindungsstellen γ aufgetragen. Die $\log Q$ -Werte, wenn $\gamma \rightarrow 0$ bzw. wenn $\gamma \rightarrow$ maximalen Wert der Bindungsstellen geht, geben die Konstanten $\log K_{T,ass}$ bzw. $\log K_{R,ass}$ an (Abb. 13).

1. Voraussetzungen für die Funktionsbetrachtung der Dissoziationszwischenstufen

Das 37 S-Hämocyanin von *Eurypelma californicum* ist eines der kooperativsten Proteine, bei dem Hillkoeffizienten, n_H , von bis zu 10 gemessen wurden. Allerdings wird die hohe Kooperativität leicht durch äußere Einflüsse herabgesetzt. So hat oft schon der Vorgang der Abtrennung des Begleitproteins mittels Gelfiltration einen Kooperativitätsverlust des 37 S-Hämocyanins zur Folge. Die Affinität zum Sauerstoff verändert sich in der Regel kaum. Aus diesem Grund verwendete ich für die funktionellen Versuche, bis

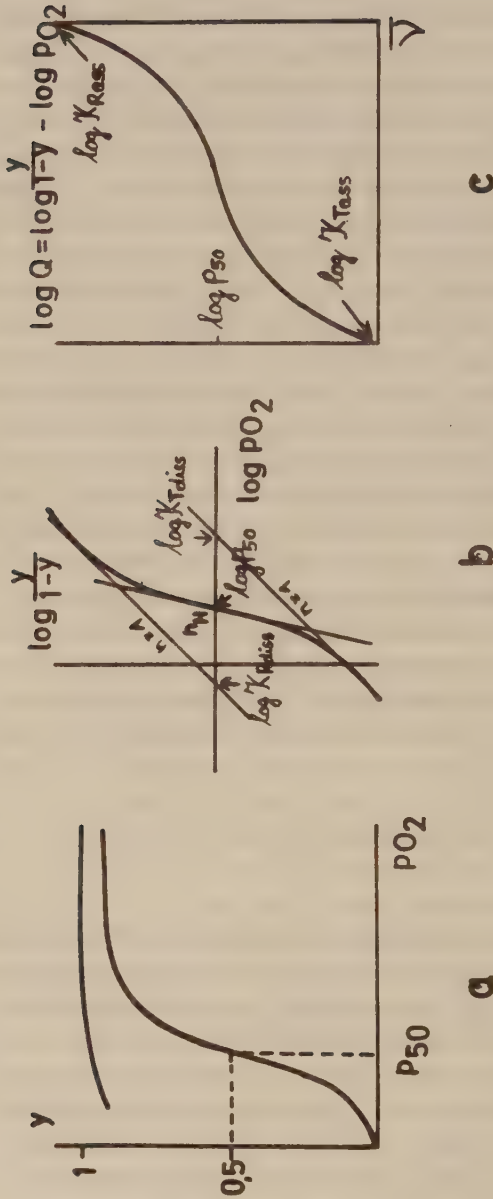


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Transformation einer Sauerstoffbindungskurve(a) in den Hillplot(b) und in den nach Edsall modifizierten Scatchardplot(c). Die Konstanten und Parameter, die daraus gewonnen werden können, sind eingetragen.

y = Sauerstoffsättigung; P_{50} = Halbsättigungsdruck (Torr); n_{50} = Kooperativität bei Halbsättigung; n_{max} = maximale Kooperativität; y = Anzahl der beladenen Untereinheiten; $K_{diss,T} = 1/K_{ass,T}$ und $K_{diss,R} = 1/K_{ass,R}$ = "intrinsische" Dissoziations- bzw. Assoziationskonstanten.

auf einige Ausnahmen frische Hämolymphe und verzichtete auf die Abtrennung des Begleitproteins.

Die Behandlungsmethoden, mit denen in Teil A die Dissoziationszwischenstufen hergestellt worden waren, sind zum Teil sehr drastische Angriffe auf das 37 S-Molekül. Es stellte sich heraus, daß zum Beispiel β -Mercaptoäthanol, mit dem in Teil A das Dodekamer und das Heptamer hergestellt worden waren, die Kooperativität des Kontroll- 37 S-Hämocyanins stark herabsetzt. Somit war das Reagens β -Mercaptoäthanol für funktionelle Versuche unbrauchbar. Auch kurzzeitige Dialyse des 37 S-Hämocyanins gegen Glycin/NaOH-Puffer, pH 9,6 setzte die Kooperativität etwas herab. Für Versuche zur Funktionsweise des Eurypelma-Hämocyanins war es also von entscheidender Bedeutung, Methoden zu finden, mit denen die Dissoziationszwischenstufen möglichst schonend, und trotzdem in möglichst großer Menge hergestellt werden können. Eine schnelle Methode, den Grad der Schädigung einer Hämocyaninprobe festzustellen, ist erfahrungsgemäß die Aufnahme eines UV-Spektrums. Das UV-Spektrum von Hämocyanin besitzt zwei Absorptionsmaxima: bei 280 nm das proteinspezifische Absorptionsmaximum und bei 340 nm ein Absorptionsmaximum, das durch den Sauerstoff-Kupfer-Komplex hervorgerufen wird. Ein weiteres Absorptionsmaximum liegt bei 560 nm. Bei denaturierten Hämocyaninen, bei denen kein Sauerstoff mehr gebunden wird, fehlen die Absorptionsmaxima bei 340 und 560 nm. Aus dem Verhältnis der Absorptionsmaxima bei 280 nm und bei 340 nm kann sehr schnell die Sauerstoffbindungskapazität und somit der Anteil an geschädigtem Hämocyanin festgestellt werden. Erfahrungsgemäß ist bei Hämocyaninproben, deren Absorptionsmaximum bei 340 nm gering ist, auch die Kooperativität niedrig.

Des Weiteren war es wichtig, die einzelnen Dissoziationszwischenstufen auf verschiedenen Wegen herzustellen, um eventuelle Einflüsse bestimmter Reagenzien auszuschließen. Ein weiteres Problem stellte die Trennung der Zwischenstu-

fen voneinander dar. Durch Elution der Banden aus einem PA-Gel konnten die einzelnen Proteinbanden zwar exakt voneinander getrennt werden, die Ausbeute an Dissoziationszwischenstufen war jedoch sehr gering, und es war auch nicht bekannt, ob das PA-Gel einen schädigenden Einfluß auf das Hämocyanin ausübt. Daher versuchte ich, die Zwischenstufen mit anderen Methoden, bei denen größere Materialmengen eingesetzt werden konnten, abzutrennen. Eine weitere Voraussetzung für funktionelle Untersuchungen war die Stabilität der Zwischenstufen. Während isoliertes 19-mer, Heptamer und Hexamer sehr stabil waren, reassozierte das Dodekamer nach der Isolierung zum Teil zum 24-mer. Somit war das so wichtige Halbmolekül einer funktionellen Untersuchung vorerst nicht zugänglich. Es mußten also zuerst Bedingungen gefunden werden, die das Dodekamer stabilisierten.

Für jede Zwischenstufe wurde das gleichermaßen behandelte 24-mer als Referenz mitisoliert, und das Sauerstoffbindungsverhalten der Zwischenstufe im Vergleich zum Sauerstoffbindungsverhalten des Referenz-24-mers untersucht.

Zunächst mußten also folgende Probleme gelöst werden:

- Auffindung schonender Herstellungsmethoden für die Zwischenstufen
- Vergrößerung der Ausbeute an Zwischenstufen
- Stabilisierung bestimmter Zwischenstufen
- Trennung der Zwischenstufen.

a) Das Hexamer

Aus den folgenden Versuchen folgt, daß das Hexamer sehr stabil ist. Hexamerfraktionen sowie verdünnte Hexamerproben (ca. 0,15 mg/ml) wurden vor und nach der Aufnahme von Sauerstoffbindungskurven in der analytischen Ultrazentrifuge untersucht. Die Proben enthielten hauptsächlich das Hexamer, das mit 16 S sedimentiert*. Einen weiteren Beweis

*für die Durchführung der S-Läufe danke ich Herrn Walter Stöcker.

für die Stabilität des Hexamers auch nach der Desoxygenierung und bei verschiedenen pH-Werten lieferte der folgende Versuch: 16 S-Hämocyanin wurde in 0,1 M Tris/HCl-Puffern von pH 7,0, 7,5, 8,0, 8,5 und 9,0 jeweils eine dreiviertel Stunde unter Rühren desoxygeniert und sofort in Gelsystem I, pH 7,5 untersucht. Ebenfalls untersucht wurden Proben, in denen sich 1 mM Magnesium und 4 mM Calcium befanden, bei pH 7,3, 8,0 und 8,8. In allen Ansätzen befand sich fast ausschließlich 16 S-Hämocyanin (Abb. 14).

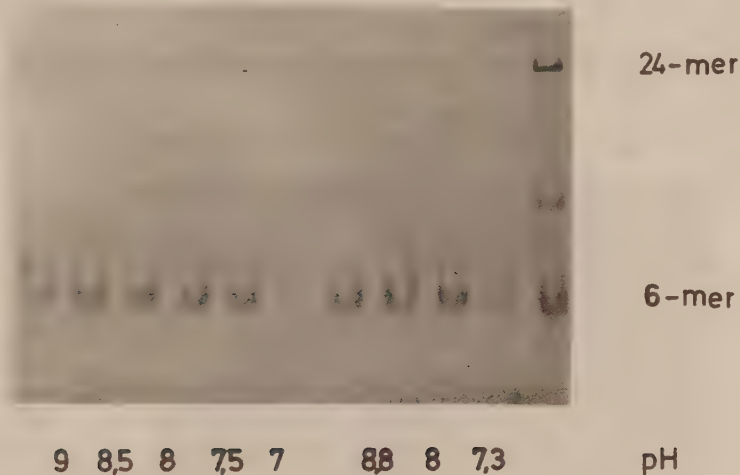


Abbildung 14:

PAGE in Gelsystem I, pH 7,5, von isolierten Hexameren, die in 0,1 M Tris/HCl-Puffer bei verschiedenen pH-Werten bzw. in Anwesenheit von 1 mM Mg und 4 mM Ca desoxygeniert wurden. Die pH-Werte sind angegeben. Aufgetragene Proteinmenge je 3 µg. (Rechts eine Referenzprobe)

Bei der Dialyse von 37 S-Hämocyanin gegen 4 M Harnstoff enthaltenden 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0 entsteht das Hexamer mit guter Ausbeute. Die Menge an gebildetem Hexamer hängt von der Dialysedauer und von der Proteinkonzentration ab. Je höher die Proteinkonzentration im Ausgangsmaterial ist, um so länger muß gegen harnstoffhaltigen

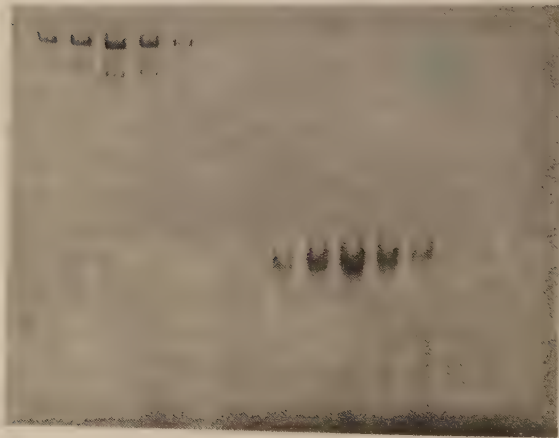
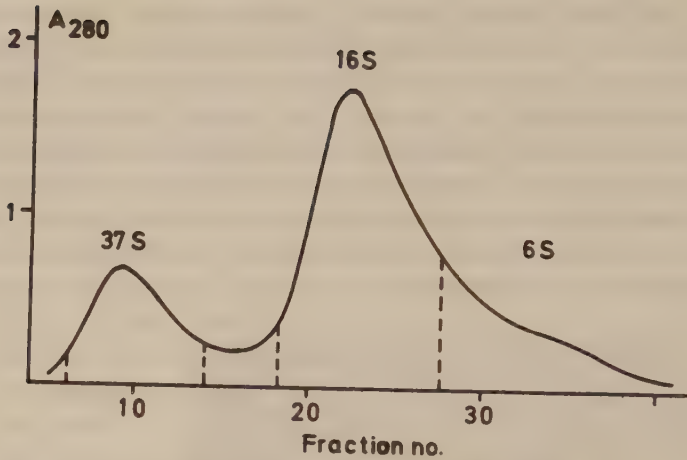


Abbildung 15 a und b:

a) Elutionsprofil einer Trennung zwischen 24-mer und Hexamer über eine Biogel A 5m Säule; Säulenlänge 1,5 m, Durchmesser 1,5 cm. Aufgetragene Proteinmenge 60 mg, Fraktionsgröße 2,5 ml, Durchlaufgeschwindigkeit 3,3 ml/Stunde.
 b) PAGE in Gelsystem I, pH 7,5 der Fraktionen. Aufgetragene Proteinmenge je 3-10 µg. Fraktionen (von links nach rechts): 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35.

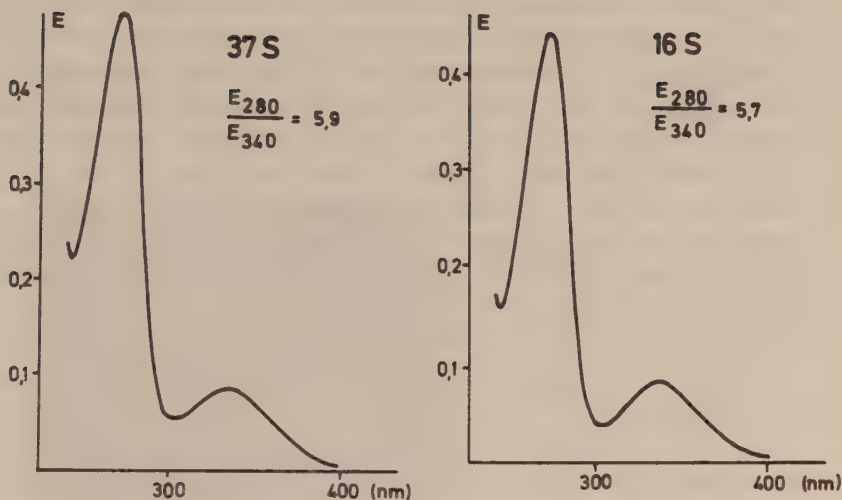


Abbildung 15 c:

UV-Spektren des isolierten 24-mers und des Hexamers. Konzentration der Proben: 16 S = 0,45 mg/ml, 37 S = 0,52 mg/ml. Das Verhältnis der Absorptionsmaxima bei 280 nm und bei 340 nm ist angegeben.

Puffer dialysiert werden. Lange Dialysezeiten erhöhen auch die Ausbeute an Hexamer. Ein Nachteil einer langen Dialyседauer ist jedoch, daß ein Teil des Hämocyanins denaturiert, und daß die Kooperativität erniedrigt wird. Als relativ schonend erwies sich eine ca. 14-stündige Dialyse bei 4°C bei einer Proteinkonzentration von ca. 9 mg/ml. Der Harnstoff wurde danach durch Dialyse der Proben gegen 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0 entfernt. Bei dieser Behandlung entstehen ca. 70 % Hexamer. Da sich die Molekulargewichte des 24-mers und des Hexamers stark unterscheiden, und da bei der Harnstoffbehandlung außer Untereinheiten keine Dissoziationszwischenstufen entstehen, erwies sich eine Gelfiltration mit Biogel A 5m als sehr gute Trennmethode (Abb.15). Dazu wurde die Proteinlösung (60 mg Pro-

tein) durch Dialyse gegen einen mit PEG gesättigten, 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0 eingengt. Die einzelnen Fraktionen wurden in Gelsystem I, pH 7,5 untersucht (Abb.15). Fraktionen, die nur das 24-mer enthielten und Fraktionen, die nur das Hexamer enthielten wurden vereinigt und auf ca. 2 mg/ml eingengt. In den Hexamerfraktionen befand sich zum Teil das 16 S-Begleitprotein, das in Gelsystem I nicht vom Hexamer unterschieden werden kann. UV-Spektren (Abb.15) des 24-mers und des Hexamers zeigten eine hohe Sauerstoffbindungskapazität der Proben.

b) Das Dodekamer

Neben dem Hexamer war das Dodekamer als Halbmolekül, das die allosterische Einheit darstellen könnte, die interessanteste Zwischenstufe. Leider zeigte das Halbmolekül eine starke Tendenz zur Reassoziaton, so daß eine Reihe von Vorversuchen zur Stabilisierung des Dodekamers nötig waren. Dazu spaltete ich 37 S-Hemocyanin wie oben beschrieben mit 5% β -Mercaptoäthanol, analysierte das Spaltgemisch in Gelsystem I, pH 7,5, behandelte es dann mit unterschiedlichen Reagenzien, die eine Stabilisierung herbeiführen sollten, dialysierte es gegen einen 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0, um alle Reagenzien zu entfernen, und analysierte das Gemisch wiederum in Gelsystem I. Ein Vergleich des Elektrophoresemusters mit dem Elektrophoresemuster gleich nach der Spaltung sollte zeigen, inwieweit eine Stabilisierung des Dodekamers gelungen war.

Magnesiumionen hatten eine leicht stabilisierende Wirkung auf das Dodekamer, wie folgender Versuch zeigt: 37 S-Hemocyanin (6mg/ml) wurde eine halbe Stunde bei 37°C in

- a) 5 % β -Mercaptoäthanol enthaltendem 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0, und unter Zusatz von
- b) 4 mM Ca, c) 1 mM Mg und d) 1 mM Mg + 4 mM Ca gespalten. Danach erfolgte Dialyse gegen den jeweiligen Spaltpuffer ohne β -Mercaptoäthanol. Abb. 16 zeigt, daß in den magnesiumhaltigen Proben

die Spaltung verstärkt wurde, und das Dodekamer zum Teil erhalten blieb, während in den anderen Proben eine fast vollständige Reassoziaton zum 24-mer (19-mer) erfolgte. Das Heptamer, das nach Isolierung stabil ist, reassozierte hier im Gemisch ebenfalls.

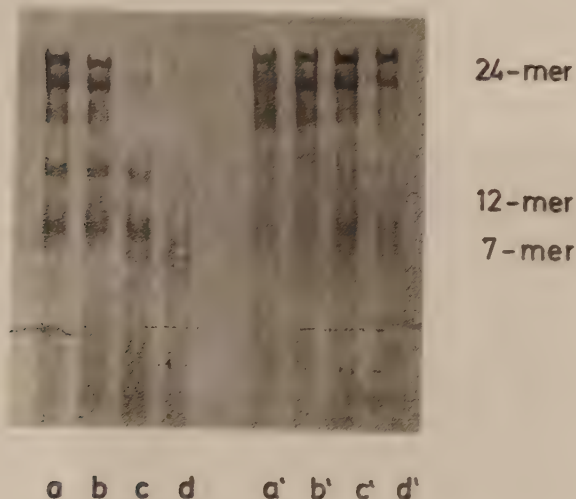


Abbildung 16:

PAGE in Gelsystem I, pH 7,5. Aufgetragene Proteinmenge je 10-20 µg.

a-d) 37 S-Hämocyanin (6 mg/ml) wurde 1/2 Stunde bei 37°C in 5% B-Mercaptoäthanol enthaltenden 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0(a), +4 mM Ca(b), +1 mM Mg(c), +1 mM Mg+4 mM Ca(d) gespalten.

a'-d') Rückdialyse der Proben gegen den jeweiligen Spalt-puffer ohne B-Mercaptoäthanol.

Ein weiterer Versuch, das Dodekamer zu stabilisieren, bestand in einer Dialyse des Spaltgemisches gegen 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0, der mit dem leicht reduzierend wirkenden Reagens Cystein, oder mit der Quecksilberverbindung PCMB versetzt war. Mit 5 mM Cystein kann sehr schonend das Homodimer ff gespalten werden (Schneider et al., 1977), das Reagens PCMB wurde von Gerhard und Schachman (1965) zur schonenden Spaltung von ATC-ase eingesetzt. Wie Abb.

17 zeigt, konnte das Heptamer zum Teil stabilisiert werden, aber das Dodekamer reassozierte stets zum 24-mer. Auch eine Dialyse des Spaltgemisches gegen 1-4 M Harnstoff enthaltenden Puffer hatte keinen Erfolg. Bis zwei M Harnstoff erfolgte Reassoziation, darüber Denaturierung des Hämocyanins. Kombinationen mit Cystein und Harnstoff bzw. PCMB + Harnstoff blieben ebenfalls erfolglos.

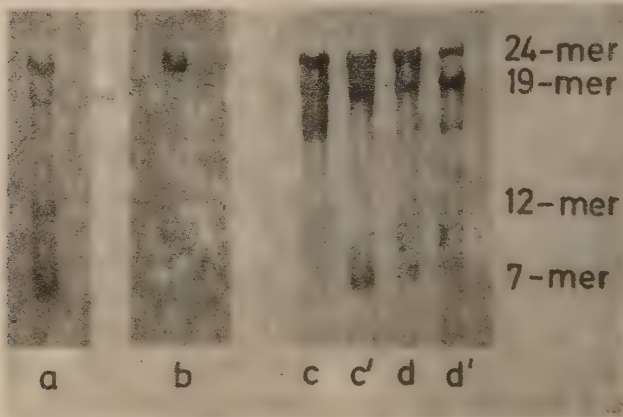


Abbildung 17:

PAGE in Gelsystem I, pH 7,5; aufgetragene Proteinmenge 10 -30 µg.

a) Spaltmuster nach einer halben Stunde Spaltung von 37 S-Hämocyanin in 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0, + 5% β-Mercaptoäthanol bei 37°C.

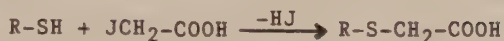
b) Behandlung wie a) + Rückdialyse gegen 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0.

c/c') Behandlung wie b), Dialysepuffer enthielt c) 5 mM Cystein, c') 50 mM Cystein.

d/d') Behandlung wie b), Dialysepuffer enthielt d) 5 mM PCMB, d') 10 mM PCMB.

Schließlich wurde versucht, die bei der Spaltung mit Reduktionsmitteln frei gewordenen SH-Gruppen durch Carboxymethylierung mit Jodessigsäure zu blockieren.

Die Reaktion verläuft nach der Formel:



Das Spaltgemisch wurde sofort nach der β -Mercaptoäthanolspaltung eine halbe Stunde bei 20°C mit Jodessigsäure in NaOH versetzt. Pro mg 37 S-Hämocyanin wurden 2,25 mg Jodessigsäure in 10 μ l 1 M NaOH eingesetzt. Die Carboxymethylierung erfolgte unter Stickstoffatmosphäre. Danach wurden β -Mercaptoäthanol und Jodessigsäure über eine mit Tris/Acryl gefüllte Säule, die mit 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0 äquilibriert war, entfernt. Die Überprüfung des carboxymethylierten Spaltgemisches im Gelsystem I, pH 7,5 zeigt, daß sowohl das Heptamer als auch das Dodekamer noch vorhanden waren (Abb. 18).

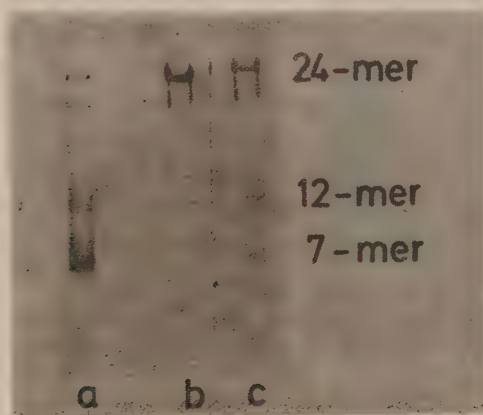


Abbildung 18:

PAGE in Gelsystem I, pH 7,5; aufgetragene Proteinmenge je 10 μ g.

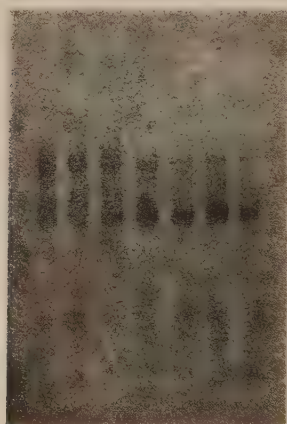
a) 37 S-Hämocyanin (6mg/ml) wurde 1/2 Stunde bei 37°C in 5% β -Mercaptoäthanol enthaltenden, 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0 gespalten.

b) Behandlung wie a), + Rückdialyse gegen 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0.

c) Behandlung wie a), dann Carboxymethylierung (s.Text), dann Rückdialyse wie b).

Geringere Mengen Jodessigsäure stabilisierten das Dodekamer nur teilweise.

Bei den meisten Spaltungen war das Heptamer stärker vertreten als das Dodekamer. Es mußte daher versucht werden, die Ausbeute an Dodekamer zu erhöhen. Dies war eine wichtige Voraussetzung für eine funktionelle Untersuchung des Dodekamers. Ich stellte fest, daß der pH-Wert des Spalt-puffers einen Einfluß auf die Menge des sich bildenden Dodekamers hat. Je niedriger der pH-Wert war, um so höher war die Ausbeute an Dodekamer gegenüber dem Heptamer. Abb. 19 zeigt Spaltgemische, die bei verschiedenen pH-Werten hergestellt worden waren.



24-mer

12-mer

7-mer

Abbildung 19:

PAGE in Gelsystem I, pH 7,5; 37 S-Hämocyanin wurde in 0,1 M Tris/HCl-Puffer + 5% β -Mercaptoäthanol, pH (von links nach rechts) 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0 gespalten (1/2 Stunde bei 37°C). Aufgetragene Proteinmenge je ca. 20 μ g.

Das Dodekamer konnte somit als stabile Zwischenstufe erhalten werden und zusammen mit dem 24-mer durch Elution

aus einem PA-Gel isoliert werden. Sauerstoffbindungskurven der beiden Komponenten zeigten jedoch, daß das Hämocyanin stark geschädigt war, und die Kooperativität des Kontroll-24-mers nur sehr niedrig war. Es mußten also schonendere Methoden für die Spaltung des 24-mers in Dodekamere gefunden werden. Relativ milde reduzierend wirkende Reagenzien sind zum Beispiel Cystein und DTT. Jedoch selbst bei hohen Cysteinkonzentrationen konnte bei neutralen und alkalischen pH-Werten keine Spaltung des 37 S-Hämocyanins erreicht werden. Versuche mit dem schon erwähnten PCMB führten auch bei hohen PCMB-Konzentrationen zu keiner Spaltung des 24-mers.

Auf Grund der Tatsache, daß bei der β -Mercaptoäthanolspaltung bei niedrigen pH-Werten eine höhere Ausbeute an Dodekamer zu erreichen war, versuchte ich mit cysteinhaltigen Acetat-Puffern unter pH 5,0 zu spalten. 37 S-Hämocyanin (4 mg/ml) wurde mit 10 mM cysteinhaltigen 0,2 M HAc/NaAc-Puffern schlagartig im Verhältnis 1:10 verdünnt und ca. 14 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die pH-Werte der Acetatpuffer betrugen: pH 4,0, 4,2, 4,4, 4,6, 4,8 und 5,0. Als Kontrolle wurde das 37 S-Hämocyanin in den verschiedenen Acetatpuffern ohne Cystein inkubiert. Abb. 20 zeigt, daß sich in den cysteinhaltigen Puffern bei pH 4,2 und 4,4 Dissoziationszwischenstufen bilden, und zwar das Dodekamer und wenig Heptamer. Bei pH 4,0 tritt teilweise Denaturierung des Hämocyanins ein, bei höheren pH-Werten wird das 24-mer nicht gespalten.

Wie bereits bei der β -Mercaptoäthanolspaltung beschrieben, neigte auch das nach saurer Cysteinspaltung erhaltene Dodekamer zur Reassoziaton. Schon die kurze Zeit, die das Auftragen der Proben in einem neutralen Gelsystem in Anspruch nahm, reichte aus, um einen Teil des Dodekamers reassoziieren zu lassen. Eine Analyse des sauren Spaltgemisches in der analytischen Ultrazentrifuge (durchgeführt von W. Stöcker) ergab zu 50 % 24 S-Hämocyanin (Dodekamer) neben ca. 40 % 37 S-Hämocyanin und ca. 10 % 18 S-Hämocyanin

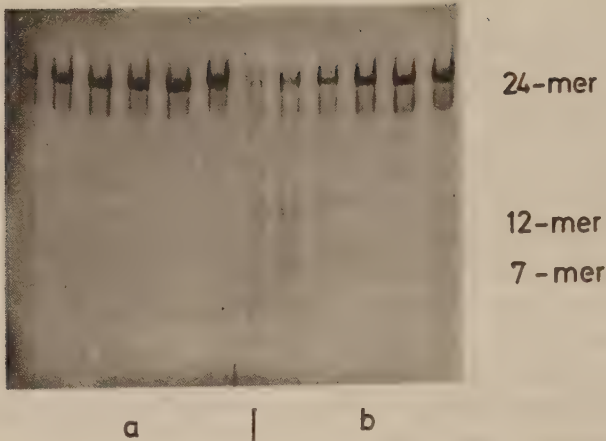


Abbildung 20:

PAGE in Gelsystem I, pH 7,5; 37 S-Hämocyanin (4 mg/ml) wurde 1:10 mit 0,2 M Natriumacetatpuffern, pH (von links nach rechts) 4,0, 4,2, 4,4, 4,6, 4,8, 5,0 verdünnt, a) ohne Cystein und b) mit 10 mM Cystein, und danach 14 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Aufgetragene Proteinmenge je ca. 8 µg.

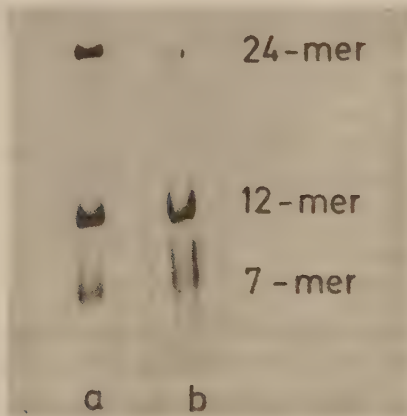


Abbildung 21:

PAGE in Gelsystem I, pH 7,5. 37 S-Hämocyanin (4mg/ml) wurde gegen 0,2 M Natriumacetatpuffer pH 4,2 a) + 10 mM Cystein b) + 100 mM Cystein 14 Stunden bei Raumtemperatur dialysiert, 1:10 mit 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0, verdünnt, carboxymethyliert und mit PEG eingeeengt. Aufgetragene Proteinmenge 20 - 30 µg.

(Heptamer). Nach Carboxymethylierung des Spaltgemisches war der große Anteil an Dodekamer auch im neutralen PA-Gel zu erkennen (Abb. 21). 100 mM Cystein im Spaltpuffer vergrößerte die Ausbeute an Dodekamer auf ca. 70 % (Abb. 21). Da jedoch das 24-mer als Referenz benötigt wurde, arbeitete ich mit 10 mM Cystein enthaltenden Spaltpuffern weiter.

Für die Carboxymethylierung mußten die sauren Proben schlagartig durch Verdünnung 1:10 mit Tris/HCl-Puffer auf pH 8,0 gebracht werden. Dadurch wurden die Proben insgesamt 1:100 verdünnt, da ja der Sprung in den sauren Bereich auch durch 1:10 Verdünnung durchgeführt worden war. In den folgenden Versuchen dialysierte ich daher das 37 S-Hämocyanin gegen den sauren Spaltpuffer. Beim Übergang über den isoelektrischen Punkt des Hämocyanins bei ca. pH 5,0 fiel das Hämocyanin nicht aus. Die Verdünnung vor der Carboxymethylierung mußte in Kauf genommen werden, da bei einer langsameren Dialyse zu viel Dodekamer zum 24-mer reassozierte. Die Proben wurden anschließend durch Dialyse gegen einen mit PEG gesättigten 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0 eingengt.

Sauerstoffbindungskurven der durch saure Cysteinspaltung erhaltenen und aus neutralen PA-Gelen eluierten Dodekamere und Kontroll-24-mere ergaben relativ gute Ergebnisse (siehe unten). Die Kooperativität des Kontroll-24-mers war zwar nicht sehr hoch, jedoch viel höher als nach der Spaltung mit β -Mercaptoäthanol. Unbefriedigend blieb die Tatsache, daß doch eine Reihe von Manipulationen nötig waren, um das Dodekamer zu erhalten: Verdünnen, Einengen und vor allem ein zweimaliger Sprung über den IEP.

Eine weitere Methode, Dodekamer zu erhalten, war die oben schon erwähnte Spaltung mit DTT. 37 S-Hämocyanin (6 mg/ml) wurde in verschiedenen molaren DTT-Puffern (0,1 M Tris/HCl-Puffer) von pH 7,0 und 8,0 unterschiedlich lange bei 37°C gespalten. Abb 22 zeigt, daß eine halbstündige Spaltung in einem 40 mM DTT enthaltenden 0,1 M Tris/HCl-Puffer bei pH 7,0 eine gute Ausbeute an Dodekamer ergibt, während bei pH 8,0 mehr Heptamer gebildet wird. Auch bei dieser Spal-

tung mußte das Spaltgemisch carboxymethyliert werden, um das Dodekamer zu stabilisieren. Bei der DTT-Spaltung tritt außer dem Dodekamer und dem Heptamer auch das 19-mer in großer Menge auf (Abb. 22).

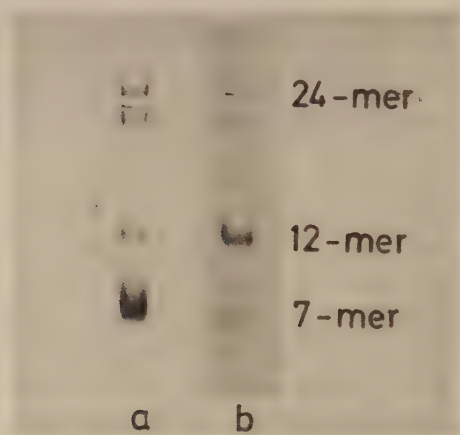


Abbildung 22:

PAGE in Gelsystem I, pH 7,5. 37 S-Hämocyanin (6mg/ml) wurde in 40 mM DTT-haltigem, 0,1 M Tris/HCl-Puffer, a) pH 8,0, b) pH 7,0 30 Min bei 37°C gespalten. Aufgetragene Proteinmenge 30 µg.

Sauerstoffbindungskurven des aus PA-Gelen eluierten Kontroll-24-mers ergaben eine verhältnismäßig gute Kooperativität (n_H bis ca. 4,0), so daß die DTT-Spaltung als schonende Methode nicht nur zur Gewinnung des Dodekamers sondern auch zur Gewinnung des Heptamers und des 19-mers anzusehen ist.

Zur Isolierung des Dodekamers in größerem Maßstab führte ich Gelfiltrationen mit verschiedenen Biogelen durch. Ich verwendete Biogel A 15m, A 5m und A 1,5m in einer zwei Meter langen Säule mit einem Durchmesser von einem cm.

Wie die Analyse der einzelnen Fraktionen in Gelsystem I, pH 7,5 zeigte, gelang in keinem Fall eine saubere Trennung des Dodekamers vom 24-mer oder vom Heptamer. Obwohl die Zwischenstufen nicht gut voneinander getrennt waren, führte ich mit einzelnen Fraktionen Sauerstoffbindungskurven durch (siehe unten), um Vergleichswerte mit anderen Isolierungsmethoden zu haben. Trennversuche mit TLG ergaben ebenfalls keine saubere Trennung der Zwischenstufen.

Die beste Methode, das Dodekamer von allen anderen Zwischenstufen abzutrennen, blieb das Herausschneiden der Proteinbanden aus PA-Gelen mit anschließender Elution der Proteine. Nachteile dieser Methode waren die sehr geringe Ausbeute, und die Tatsache, daß nach der Elution des Proteins keine Proteinkonzentrationsbestimmung durch Messung der optischen Dichte bei 280 nm möglich war, und somit auch keine Aufnahme eines UV-Spektrums. Offenbar störten winzige PA-Teilchen in der Probe die Messung. Die Konzentrationen der Proben wurden daher aus der Intensität der isolierten Proteinbanden in Gelsystem I, pH 7,5 abgeschätzt. Da die Messung von Sauerstoffbindungskurven mittels der fluorometrischen Methode sehr empfindlich ist, und auch bei geringen Proteinkonzentrationen (bis zu 5 µg/ml) noch gute Ergebnisse erzielt werden können, konnte trotz der genannten Nachteile zur Isolierung der Dissoziationszwischenstufen die Gelschneidemethode angewandt werden. Abb. 23 zeigt eine Isolierung des Dodekamers zusammen mit dem 19-mer, dem Heptamer und als Referenz dem 24-mer nach DTT-Spaltung.

Bevor das Spaltgemisch auf das präparative Gel aufgetragen wurde, wurde eine 20-minütige Vorelektrophorese durchgeführt, um eventuell schädigende lösliche Bestandteile aus dem PA-Gel zu entfernen. Die Elektrophorese des Proteingemisches wurde bei 200 Volt bei 4°C durchgeführt und dauerte ca. vier Stunden.

Die Voraussetzungen für funktionelle Untersuchungen des Dodekamers waren somit gegeben. Die Zwischenstufe konnte

relativ schonend nach zwei unterschiedlichen Methoden in ausreichender Menge hergestellt, stabilisiert und isoliert werden.

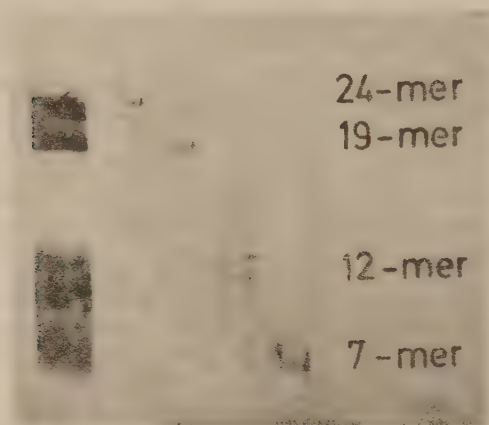


Abbildung 23:

PAGE in Gelsystem I, pH 7,5. Von links nach rechts: Spaltmuster nach DTT-Spaltung in 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,0 + 40 mM DTT, 30 Min bei 37 °C (Gelstreifen eines präparativen Gels); isoliertes 24-mer, 19-mer, Dodekamer und Heptamer. Je 20 µl der Proteinlösung wurden aufgetragen.

c) Das Heptamer

Das isolierte Heptamer ist stabil, es reassoziert nicht und zerfällt nicht in Untereinheiten. Es kann schonend mit den gleichen Methoden wie das Dodekamer hergestellt werden: saure Cysteinspaltung und DTT-Spaltung bei pH 8,0. Eine Carboxymethylierung ist für die Gewinnung des Heptamers nicht nötig. Abb. 24 zeigt das isolierte Heptamer und als Referenz das 24-mer nach DTT-Spaltung bei pH 8,0.

Für die meisten funktionellen Untersuchungen wurde das Heptamer zusammen mit dem Dodekamer und dem 19-mer nach Carboxymethylierung des Spaltgemisches isoliert. Die an nicht carboxymethyliertem Heptamer gewonnenen Sauerstoffbindungskurven erbrachten sehr wichtige Vergleichswerte.

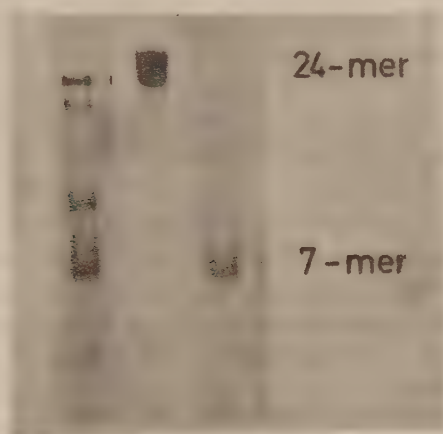


Abbildung 24:

PAGE in Gelsystem I, pH 7,5. Von links nach rechts: 37 S-Hämocyanin (6 mg/ml) wurde eine halbe Stunde bei 37°C in 40 mM DTT-haltigem, 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0 gespalten und das Spaltgemisch aufgetrennt; isoliertes 24-mer; isoliertes Heptamer; aufgetragene Proteinmenge: Spaltgemisch 20 µg, isolierte Proteinbanden je 20 µl.

d) Das 19-mer

Das 19-mer entsteht zusammen mit dem Dodekamer und dem Heptamer bei der DTT-Spaltung. Die Bildung des 19-mers ist unabhängig vom pH-Wert des Spaltpuffers. Außerdem wird die 19-mere Zwischenstufe in größerer Menge nach ca. zweistündiger Dialyse von 37 S-Hämocyanin gegen Glycin/NaOH-Puffer, pH 9,6, I=0,05 gebildet. Auch ca. 14-stündige Dia-

lyse von 37 S-Hämocyanin gegen 20% Saccharose enthaltenden, 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0 (Markl et al., 1980) führt zur verstärkten Bildung von 19-mer. In geringer Menge ist das 19-mer immer vorhanden, wenn 37 S-Hämocyanin einer PAGE in Gelsystem I, pH 7,5 unterworfen wird. Die präparative Isolierung dieses ohne Vorbehandlung gebildeten 19-mers aus einem PA-Gel stellt die schonendste Methode zur Gewinnung des 19-mers dar. Nach allen oben beschriebenen Methoden wurde 19-mer hergestellt, mittels der Gelschneidemethode isoliert und funktionell untersucht. Eine Stabilisierung des 19-mers war nicht nötig. Für die meisten funktionellen Versuche wurde das 19-mer zusammen mit dem Dodekamer und dem Heptamer nach DTT-Spaltung und Carboxymethylierung des Spaltgemisches isoliert. Während das 19-mer bei den meisten Spaltungen mit DTT nicht vollständig vom 24-mer abgetrennt werden konnte, gelang in einigen Versuchen eine vollständige Trennung; so zum Beispiel nach zweistündiger Dialyse des 37 S-Hämocyanins gegen Dissoziationspuffer oder nach der Inkubation des 37 S-Hämocyanins in saccharosehaltigem Puffer (Abb.25).



Abbildung 25:

PAGE in Gelsystem I, pH 7,5. Von links nach rechts: 24-mer und 19-mer nach 14-stündiger Inkubation von 37 S-Hämocyanin in 20% Saccharose enthaltenden 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0; aufgetragene Proteinmenge 20 µg. Isoliertes 24-mer. Isoliertes 19-mer. Je 20 µl der Proteinlösung wurden aufgetragen.

In Tabelle 9 sind die zur funktionellen Untersuchung der Dissoziationszwischenstufen wichtigen Herstellungs- und Isolierungsmethoden zusammengestellt.

Tabelle 9:

Zusammenfassung der für die Dissoziationszwischenstufen wichtigen Herstellungs- und Isolierungsmethoden

Hc-Aggregat	Herstellungsmethode	Isolierungsmethode
24-mer	ist stets als Rest bei der Herstellung der Zwischenstufen vorhanden	wird jeweils als Referenz mitisoliert
19-mer	ist stets bei der Elektrophorese des 37 S-Hc's in Gelsystem I vorhanden 2-stündige Dialyse des 37 S-Hc's bei Raumtemperatur gegen Gly/OH-Puffer pH 9,6 Spaltung der Hämolympheproteine in 40 mM DTT-haltigem 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 7-8, 1/2 Std. bei 37°C 14-stündige Dialyse des 37 S-Hc's bei Raumtemperatur gegen 20% Saccharose enthaltenden 0,1 M Tris/HCl-Puffer pH 8,0	Herausschneiden der Proteinbande aus Gelsystem I
12-mer	Spaltung der Hämolympheproteine in 40 mM DTT enthaltendem 0,1 M Tris/HCl-Puffer pH 7,0, 1/2 Std. bei 37°C + Carboxymethylierung Spaltung der Hämolympheproteine in 0,2 M Acetatpuffer pH 4,2 + 10 mM Cystein, 24 Std. bei Raumtemperatur + Carboxymethylierung	Herausschneiden der Proteinbanden aus Gelsystem I Gelfiltration mit Biogel A 15m
7-mer	Spaltung der Hämolympheproteine in 40 mM DTT-haltigem 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0, 1/2 Std. bei 37°C	Herausschneiden der Proteinbande aus Gelsystem I
6-mer	14-stündige Dialyse der Hämolympheproteine gegen 4 M Harnstoff enthaltenden 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0	Gelfiltration mit Biogel A 5m

2. Sauerstoffbindungsdaten für die Dissoziationszwischenstufen

Für den funktionellen Vergleich der Dissoziationszwischenstufen war es von entscheidender Bedeutung, daß alle Komponenten, auch das als Referenz mitisolierte 37 S-Hämocyanin gleichermaßen behandelt worden waren. Diesen Vorteil bot die Spaltung mit DTT, bei der das 24-mer, das 19-mer, das Dodekamer und das Heptamer aus dem gleichen PA-Gel isoliert wurden. Als Vergleichswerte waren jedoch die funktionellen Daten der mit anderen Methoden hergestellten oder isolierten Zwischenstufen von großer Bedeutung. Für einige Versuche wurde dem Tris/HCl-Puffer, mit dem das Protein aus dem Gel eluiert wurde, 10 mM Mg und 10 mM Ca zugesetzt, um den Einfluß der Mg- und Ca-Ionen auf die Stabilität der Zwischenstufen zu testen. Es konnte jedoch kein Unterschied zu den ohne Ca/Mg eluierten Zwischenstufen festgestellt werden.

Im folgenden Teil der Arbeit wird zunächst die Sauerstoffbindung des Hexamers beschrieben. Da das Hexamer als einzige Zwischenstufe nach Harnstoffbehandlung des 37 S-Hämocyanins hergestellt wurde, können die funktionellen Daten nicht direkt mit den Daten der nach Spaltung mit reduzierenden Reagenzien gewonnenen Zwischenstufen 19-mer, Dodekamer und Heptamer verglichen werden. Ein Vorteil bei der Gewinnung des Hexamers war die hohe Ausbeute an Hexamer, das durch Gelfiltration isoliert wurde. So konnten mit dieser Zwischenstufe sehr viele funktionelle Versuche durchgeführt werden, was vor allem bei der Bestimmung des Bohr-Effektes, d.h. der Affinität zu Sauerstoff bei verschiedenen pH-Werten sehr hilfreich war.

Die Kooperativität der 37 S-Referenzproben ist im allgemeinen niedriger, als die Kooperativität von frischem Hämocyanin. Das zeigt, daß alle Reagenzien irgendeinen schädigenden Einfluß auf das Hämocyanin ausüben. Das Ausmaß der Schädigung hängt von einer Reihe verschiedener Fakto-

ren ab, die später diskutiert werden. Da für die zahlreichen Präparationen der einzelnen Zwischenstufen erstens unterschiedliche Behandlungsmethoden angewandt wurden, zweitens auch bei gleicher Behandlung nicht immer exakt die gleichen Bedingungen herrschten, und drittens unterschiedliche Ausgangsmaterialien eingesetzt wurden, unterscheiden sich die Kooperativitätswerte sowohl für die 37 S-Kontrolle als auch für die Dissoziationszwischenstufen von Präparation zu Präparation. Daher ist es nicht sinnvoll Durchschnittswerte zu bilden; die Ergebnisse aller Präparationen werden in Tabellen aufgeführt (Tabelle 10-14). In den Abbildungen werden nur die Ergebnisse der besten Präparationen verwertet. Die Zulässigkeit dieser Auswertungsmethode wird unten diskutiert.

a) Sauerstoffbindungseigenschaften des Hexamers

Die Sauerstoffbindungskurven wurden mit der fluorometrischen Methode nach Loewe (1978) gemessen. Die Proteinkonzentration in den Proben betrug ca. 0,15 mg/ml. Alle Messungen wurden bei 20°C durchgeführt. Die verschiedenen pH-Werte wurden durch Verdünnen der ca. 2 mg/ml Protein enthaltenden Proben mit 0,1 M Tris/HCl-Puffern hergestellt. Der pH-Wert änderte sich während der Messung einer Sauerstoffbindungskurve nicht. Es wurden drei Versuchsreihen mit verschiedenem Material durchgeführt: I1, I2 und I3.

I1: als Ausgangsmaterial wurde über Gelfiltration vom Begleitprotein abgetrenntes 37 S-Hämocyanin verwendet. Nur die Hexamerfraktion wurde funktionell untersucht.

I2: als Ausgangsmaterial wurde über Gelfiltration vom Begleitprotein abgetrenntes 37 S-Hämocyanin verwendet; die Kooperativität des Ausgangsmaterials war mit $n_{50} = 3,0$ ziemlich niedrig. Das bedeutet, das Hämocyanin war bereits durch die Vorbehandlung geschädigt. Die 24-mer-Fraktion und die Hexamerfraktion wurden untersucht.

I3: als Ausgangsmaterial wurde frische Hämolymphe verwendet. Die Kooperativität betrug $n_{50} = 6,0$ und $n_{\max} = 8,0$. Die 24-mer-Fraktion und die Hexamerfraktion wurden untersucht.

Die Ergebnisse aller drei Versuchsreihen sind in Tabelle 10-12 zusammengefasst. Abb. 26 zeigt originale Sauerstoffbindungskurven des 24-mers und des Hexamers. In Abb. 27 ist die Transformation der Sauerstoffbindungskurven bei verschiedenen pH-Werten in Hill- und Scatcharddiagramme dargestellt. Abb. 28 zeigt die Abhängigkeit des p_{50} , der Kooperativität und des $\log K_{T,ass}$ vom pH-Wert für 24-mere und Hexamere.

Tabelle 10:
Sauerstoffbindungsdaten für I1

<u>Hexamer</u>						
pH	$\log p_{50}$	p_{50}	n_{50}	$n_{\max}$	$\log K_{T,ass}$	$\log K_{R,ass}$
7,12	1,23	16,98	1,18	1,57	-1,28	0 - (-0,1)
7,41	1,10	12,59	1,27	1,54	-1,18	"
7,58	1,05	11,22	1,22	1,54	-1,09	"
7,66	0,96	9,12	1,23	1,61	-1,03	"
7,67	1,03	10,71	1,21	1,34	-1,12	"
7,73	1,01	10,23	1,25	1,67	-1,10	"
8,10	0,83	6,76	1,30	1,53	-0,90	"
8,41	0,77	5,89	1,30	1,53	-0,88	"
8,71	0,66	4,57	1,35	1,58	-0,80	"
9,08	0,69	4,90	1,28	1,32	-0,75	"

maximaler Bohreffekt: $\Delta \log p_{50} / \Delta pH = -0,55$ zwischen pH 7,7 und 8,0.

Tabelle 11:
Sauerstoffbindungsdaten für I2

24-mer						
pH	log p ₅₀	p ₅₀	n ₅₀	n _{max}	log K _{Tass}	log K _{Rass}
7,43	1,25	17,78	1,70	2,53	-1,45	0,2
7,64	1,14	13,96	2,35	2,91	-1,45	"
7,65	1,06	11,48	2,27	3,37	-1,60	"
7,82	0,92	8,32	2,24	3,09	-1,50	"
8,04	0,95	9,01	2,61	3,33	-1,60	"
8,08	0,90	7,94	2,83	3,66	-1,60	"
8,16	0,93	8,51	2,68	3,70	-1,60	"
8,54	0,71	5,18	2,50	3,92	-1,27	"
8,60	0,58	3,80	2,47	2,74	-1,25	"
8,95	0,59	3,89	2,86	2,86	-1,26	"

maximaler Bohreffekt $\Delta \log p_{50} / \Delta \text{pH} = -0,64$ zwischen
pH 7,9 und 8,1

Hexamer						
pH	log p ₅₀	p ₅₀	n ₅₀	n _{max}	log K _{Tass}	log K _{Rass}
7,42	1,12	13,33	1,18	1,42	-1,15	0 - 0,1
7,45	1,12	13,18	1,00		-1,11	"
7,74	1,01	10,23	1,14	1,85		
7,80	1,00	10,00	1,14	1,67	-1,00	"
8,03	0,85	7,08	1,07	1,42	-0,87	"
8,12	0,92	8,32	1,19	1,96	-0,75	"
8,12	0,81	6,45	1,13	1,70	-0,83	"
8,62	0,74	5,41	1,13	1,92	-0,75	"
8,88	0,67	4,68	1,10	1,44	-0,70	"

maximaler Bohreffekt $\Delta \log p_{50} / \Delta \text{pH} = -0,66$ zwischen
pH 7,9 und 8,1.

Tabelle 12:
Sauerstoffbindungsdaten für I3

24-mer						
pH	log p ₅₀	p ₅₀	n ₅₀	n _{max}	log K _{Tass}	log K _{Rass}
7,16	1,30	19,95	1,88	2,50	-1,74	0,3
7,61	1,34	21,90	1,93	2,30	-1,73	"
7,66	1,30	19,95	2,14	3,05	-1,70	"
7,83	1,18	15,07	3,30	4,50	-1,80	"
8,06	1,09	12,30	3,75	5,10	-2,10	"
8,06	1,02	10,47	3,12	4,79	-2,10	"
8,33	0,92	8,32	3,65	4,96	-1,85	"
8,66	0,72	5,25	3,26	4,18	-2,10	"
9,00	0,64	4,36	3,33	4,03	-1,70	"

maximaler Bohreffekt $\Delta \log p_{50} / \Delta \text{pH} = -0,67$ zwischen
pH 9,7 und 8,1.

Hexamer						
pH	log p ₅₀	p ₅₀	n ₅₀	n _{max}	log K _{Tass}	log K _{Rass}
7,00	1,33	21,63	1,39		-1,41	0 - (-0,1)
7,13	1,32	20,89	1,33	2,26	-1,40	"
7,32	1,35	22,39	1,38	2,21	-1,41	"
7,68	1,27	18,62	1,41	2,15	-1,35	"
8,00	1,08	12,02	1,62	1,84	-1,26	"
8,00	1,04	10,96	1,58	2,10	-1,25	"
8,03	1,00	10,00	1,47	1,74	-1,00	"
8,05	0,97	9,33	1,33	1,73	-1,01	"
8,37	0,83	6,76	1,44	1,70	-0,93	"
8,59	0,76	5,75	1,40	1,76	-0,86	"
8,90	0,75	5,62	1,24	1,56	-0,82	"

maximaler Bohreffekt $\Delta \log p_{50} / \Delta \text{pH} = -0,72$ zwischen
pH 7,9 und 8,1

7,32*	1,35	22,39	1,55	2,08	-1,49	"
8,03*	1,03	10,84	1,51	1,83	-1,29	"
8,81*	0,67	4,62	1,33	1,43	-0,85	"

* 4 mM Calcium + 1 mM Magnesium im Meßpuffer

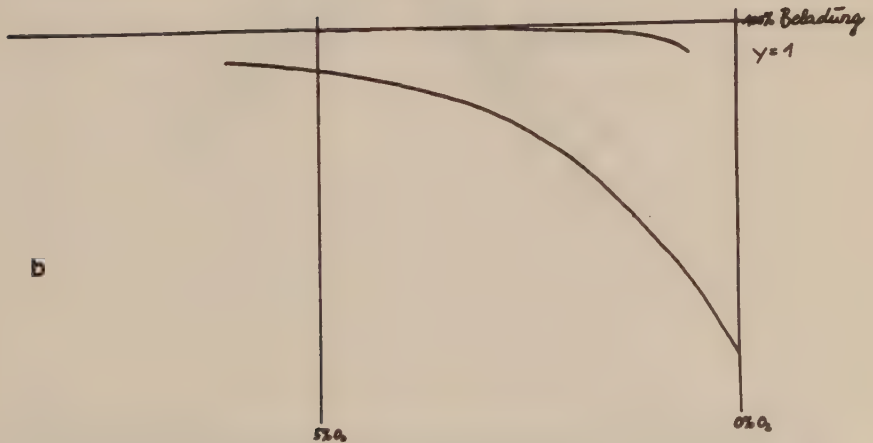
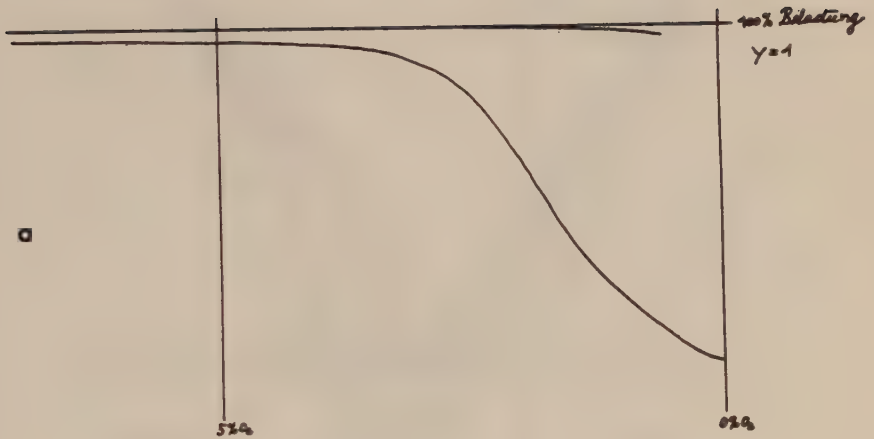


Abbildung 26:
Originale Sauerstoffbindungskurven a) des 24-mers und
b) des Hexamers; Meßbedingungen: 0,1 M Tris/HCl-Puffer,
pH 8,0, Temperatur 20°C, Proteinkonzentration 0,15 mg/ml.
Der untere Teil der Kurve wurde bei 10-facher Spreizung (x-Achse)
des oberen Teil gemessen.

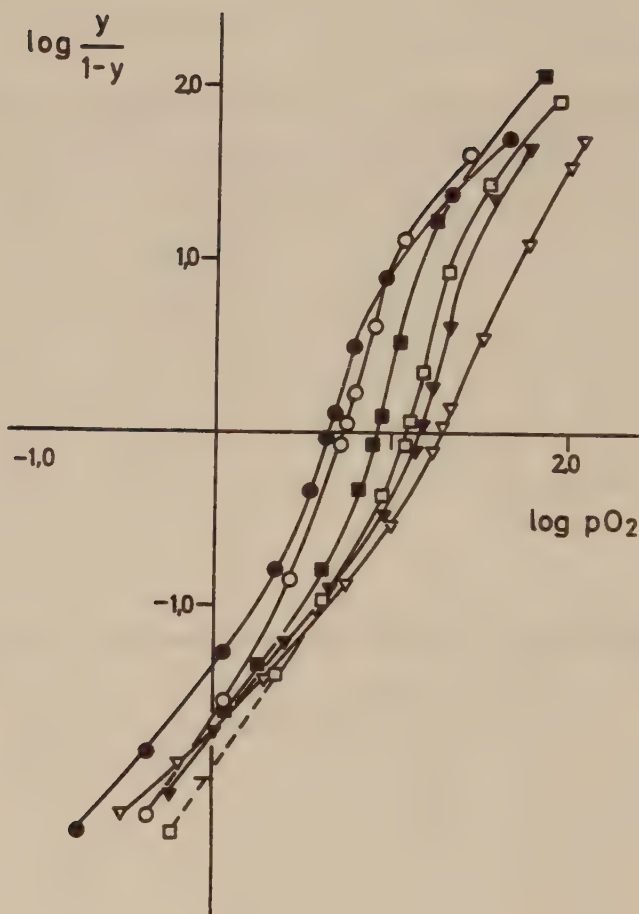


Abbildung 27 a-d:

Hilldiagramme und modifizierte Scatcharddiagramme von den Sauerstoffbindungskurven der aus I3 gewonnenen 24-mer- und Hexamer-Fraktionen bei verschiedenen pH-Werten. Meßbedingungen: 0,1 M Tris/HCl-Puffer, Temperatur 20°C, Proteinkonzentration 0,15 mg/ml; Sauerstoffbindungsparameter siehe Tabelle 12.

a) Hilldiagramm 24-mer: pH 7,6 ▽, pH 7,8 ▼, pH 8,1 □, pH 8,3 ■, pH 8,7 ○, pH 9,0 ●.

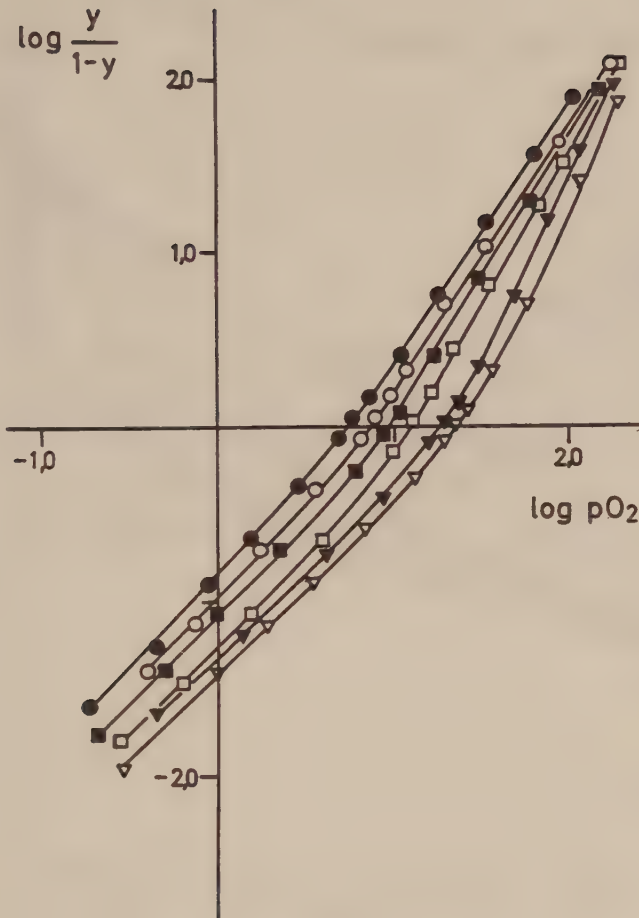


Abbildung 27 b)

Hilldiagramm Hexamer: pH 7,3 ▽, pH 7,7 ▼, pH 8,0 □, pH 8,1 ■, pH 8,4 ○, pH 8,9 ●.

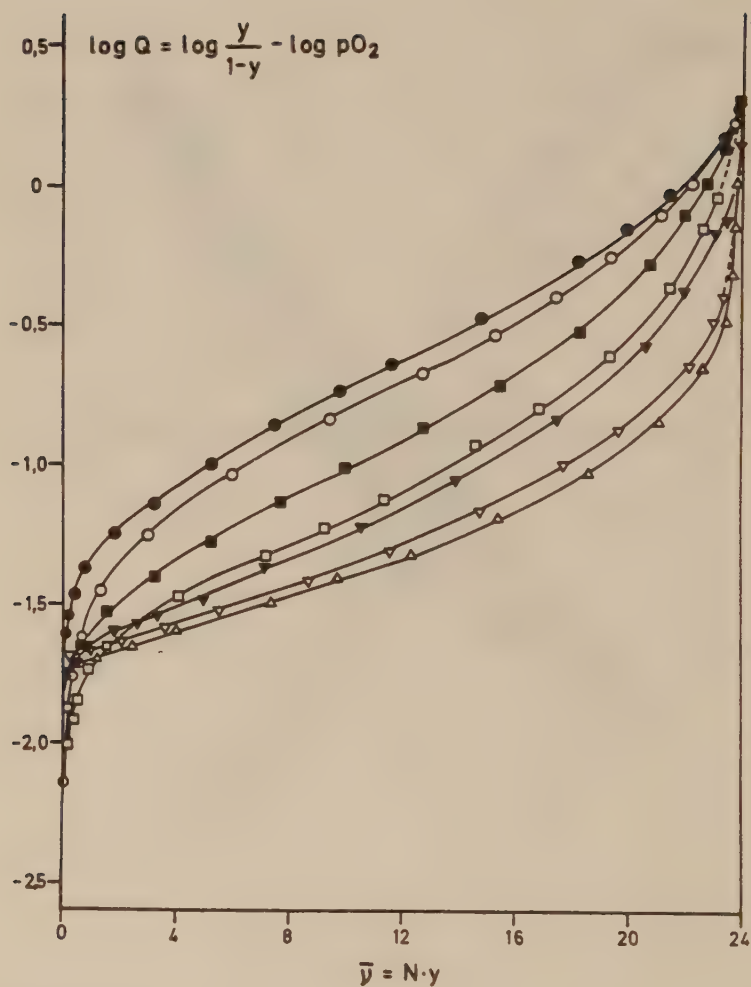


Abbildung 27 c)

Scatcharddiagramm 24-mer: pH 7,6 ∇ , pH 7,8 $\blacktriangledown$, pH 8,1 $\square$,
pH 8,3 $\blacksquare$, pH 8,7 $\circ$, pH 9,0 $\bullet$.

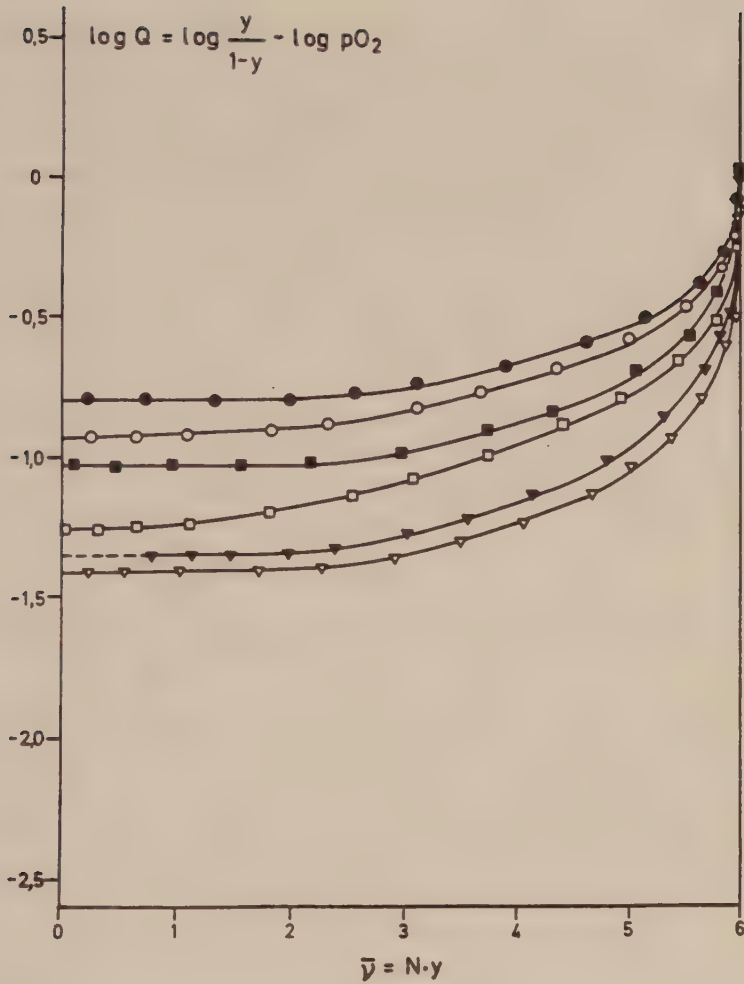


Abbildung 27 d)

Scatcharddiagramm Hexamer: pH 7,3 ∇ , pH 7,7 $\blacktriangledown$, pH 8,0 $\square$,
pH 8,1 $\blacksquare$, pH 8,4 $\circ$, pH 8,9 $\bullet$.

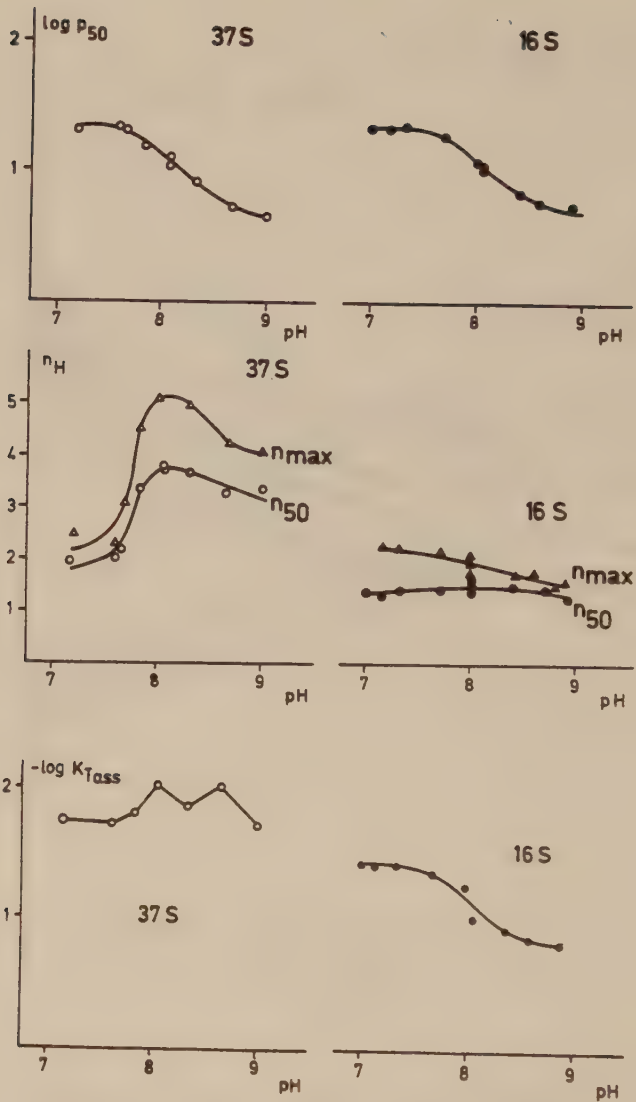


Abbildung 28:
 Abhängigkeit des p_{50} , des n_H und des $\log K_{T,ass}$ vom pH-Wert
 beim 24-mer und beim Hexamer. Bohreffekt des 24-mers
 $\Delta \log p_{50} / \Delta pH = -0,68$; Bohreffekt des Hexamers $\Delta \log p_{50} / \Delta pH$
 $= -0,7$; $\Delta \log K_{T,ass} / \Delta pH = 0,7$. Sauerstoffbindungsdaten aus
 I3; Meßbedingungen siehe Abb.27.

Die Sauerstoffbindungscharakteristika des Vergleichs-24-mers ähneln denen des nativen 37 S-Hämocyanins, obwohl die Kooperativität und der Bohr-Effekt bei I3 etwas, bei I2 viel niedriger sind. Der Bohr-Effekt ist beim Hexamer im Vergleich zum Kontroll-24-mer vollständig erhalten; die Kooperativität ist jedoch sehr viel niedriger und unabhängig vom pH-Wert; $n_{\max}$ bei ca. 80 %iger Sättigung des Hämocyanins mit Sauerstoff ist sowohl beim 24-mer als auch beim Hexamer stets höher als n_{50} . Während die $\log K_T$ -Werte beim 24-mer unabhängig vom pH-Wert sind, ist beim Hexamer eine pH-Abhängigkeit festzustellen, die dem Bohr-Effekt entspricht. Vergleicht man die Präparationen I2 und I3 miteinander, so stellt man fest, daß der Bohr-Effekt etwa gleich groß ist, obwohl die Kooperativitäten des 24-mers und des Hexamers bei I2 geringer sind.

b) Sauerstoffbindungseigenschaften des Heptamers, des Dekamers und des 19-mers

Die für funktionelle Untersuchungen zur Verfügung stehenden Mengen dieser Zwischenstufen waren wegen der kleinen Ausbeute bei der Isolierung sehr gering. Pro Präparation konnten zum Teil nur ein bis zwei Sauerstoffbindungskurven gemessen werden. Da bereits das Hexamer als kleinste Zwischenstufe den gleichen Bohr-Effekt zeigt wie das 24-mer, erübrigte sich für die zwischen Hexamer und 24-mer liegenden Zwischenstufen die genaue Bestimmung des Bohr-Effektes. So wurde nur bei drei pH-Werten, pH 7,7, 8,0 und 8,4 getestet, ob der Bohr-Effekt vorhanden ist, und ob Unterschiede zum 24-mer bestehen. Das Hauptinteresse bei der funktionellen Untersuchung des Heptamers, des Dekamers und des 19-mers galt der Kooperativität. Daher wurden die meisten Versuche in 0,1 M Tris/HCl-Puffern bei pH $8,0 \pm 0,2$ durchgeführt. Alle Sauerstoffbindungskurven wurden mit der fluorometrischen Methode nach Loewe (1978)

gemessen. Die Temperatur betrug stets 20°C, die Proteinkonzentrationen der Proben schwankten zwischen 0,01 und 0,12 mg/ml. Während bei allen Sauerstoffbindungskurven die Affinität zu Sauerstoff am p_{50} , und die Kooperativitäten n_{50} und n_{max} gut bestimmt werden konnten, war die Bestimmung der Konstanten K_T und K_R nicht immer möglich. Vor allem bei sehr verdünnten Proteinlösungen waren die Kurven bei sehr hoher und sehr niedriger Sauerstoffbeladung oft nicht mehr auswertbar.

In Tabelle 13 sind die Ergebnisse bei pH 8,0 für das Heptamer, das Dodekamer, das 19-mer und das jeweilige Kontroll-24-mer zusammengestellt. Einige Sauerstoffbindungskurven wurden in 10 mM Mg und 10 mM Ca enthaltenden 0,1 M Tris/HCl-Puffern gemessen, um den Einfluß von Calcium und Magnesium auf das funktionelle Verhalten der Zwischenstufen zu testen. Die Methoden zur Gewinnung der Dissoziationszwischenstufen werden angegeben.

Aus den Sauerstoffbindungsdaten ist eindeutig zu schließen, daß das Dodekamer (Halbmolekül) nicht die allosterische Einheit darstellt. Die Kooperativität des Dodekamers ist in jedem Fall viel geringer als die Kooperativität des Kontroll-24-mers. Auch das 19-mer, dem nur fünf Monomere fehlen, zeigt eine deutlich niedrigere Kooperativität als das 24-mer. Besonders wertvoll sind in dieser Hinsicht die Versuche, bei denen das 19-mer ohne Vorbehandlung des 24-mers, bzw. nach der sehr schonenden Saccharosebehandlung gewonnen wurde. In diesem Fall kann nämlich jeglicher Einfluß irgendwelcher Reagenzien auf die Kooperativität der Dissoziationszwischenstufe ausgeschlossen werden.

Die Kooperativität des Heptamers ist am geringsten und entspricht etwa der Kooperativität des Hexamers. Die Affinität zu Sauerstoff bei Halbsättigung ist bei allen Zwischenstufen praktisch gleich. Durch die Anwesenheit von 10 mM Mg + 10 mM Ca wird die Affinität zu Sauerstoff für alle Zwischenstufen gleichermaßen erhöht. Auch die Kooperativität ist bei Anwesenheit von 10 mM Mg + 10 mM Ca et-

Tabelle 13:

Sauerstoffbindungsdaten der Zwischenstufen Heptamer, Dodekamer, 19-mer und des jeweiligen Kontroll-24-mers aus unterschiedlichen Präparationen. Bis auf I'9 erfolgte die Isolierung durch Herausschneiden der Proteinbanden aus PA-Gelen. Die Messungen erfolgten in 0,1 M Tris/HCl-Puffern, pH $8,0 \pm 0,1$; es wurden zum Teil Mittelwerte aus zwei bis drei Messungen gebildet. Die maximalen Abweichungen der Mittelwerte von den Einzelwerten betrugen für p_{50} :10%, für n_{50} :6%, für n_{max} :7%.

Hc-Aggregat	p_{50}	n_{50}	n_{max}	$\log K_{Tass}$	$\log K_{Rass}$
<u>I'1:</u> Hämolymphe zwei Stunden gegen Dissoziationspuffer dialysiert; Messung bei pH=7,8.					
24-mer	15,8	2,5	3,6	-1,63	0,48
19-mer	12,9	1,8	2,4	-1,44	0,3
<u>I'2:</u> Unbehandelte Hämolymphe					
24-mer	9,2	3,4	4,5	-2,0	0,6
19-mer	7,7	1,8	2,3	-1,23	0,3
<u>I'3:</u> 37 S-Hämocyanin über Nacht gegen Saccharoselösung dialysiert					
24-mer	10,8	4,0	7,6	-1,9	
19-mer	10,5	2,8	4,4	-1,87	
<u>I'4:</u> 37 S-Hämocyanin über Nacht gegen Saccharoselösung dialysiert					
24-mer	9,2	2,8	3,9	-1,74	0,42
19-mer	8,0	1,8	2,2	-1,22	0,3
<u>I'5:</u> Hämolymphe gegen cysteinhaltigen Acetatpuffer dialysiert. Messung mit 10 mM Magnesium + 10 mM Calcium					
24-mer	4,0	3,9	4,2	-1,9	0,75
19-mer	4,6	2,7	3,0	-1,55	0,31
12-mer	3,4	2,0	2,2		
<u>I'5:</u> DTT-Spaltung von Hämolympheproteinen, Messung mit 10 mM Magnesium + 10 mM Calcium					
24-mer	4,2	3,2	3,7	-1,6	
19-mer	4,1	2,6	3,0	-1,52	0,35
12-mer	4,6	2,5	2,6	-1,4	0,26
7-mer + (12-mer)	6,1	2,1	2,1		

Hc-Aggregat	p ₅₀	n ₅₀	n _{max}	log K _{Tass}	log K _{Rass}
-------------	-----------------	-----------------	------------------	-----------------------	-----------------------

I'7: DTT-Spaltung von Hämolympheproteinen

24-mer	11,4	3,3	3,8	-1,8	0,6
19-mer + (24-mer)	12,0	3,1	3,1	-1,6	0,34
12-mer	11,6	2,5	2,8	-1,6	0,42
7-mer	10,0	1,6	1,8	-1,12	0,1

I'8: DTT-Spaltung von Hämolympheproteinen; * Messung mit 10 mM Magnesium + 10 mM Calcium

24-mer	11,2 * 4,1	2,6 3,8	3,4 3,8	-1,9 -1,33	0,45
19-mer + (24-mer)	10,0 * 3,9	2,3 3,3	2,8 3,3	-1,73 -1,23	
12-mer	8,1 * 4,2	2,2 2,6	2,7 2,6	-1,33 -1,1	0,3
7-mer	8,2 * 4,3	1,4 1,6	1,5 1,6	-1,2 -0,88	0,13

I'9: Biogelisolierung nach saurer Cysteinspaltung

24-mer + (12-mer)	8,6	3,0	3,0	-1,6	
12-mer + (24-mer)	8,04	2,1	2,2	-1,04	

I'10: saure Cysteinspaltung

24-mer	11,2	2,6	3,0		
12-mer	6,7	2,0	2,1	-1,24	
7-mer	8,4	1,5	1,7	-1,15	

I'11: DTT-Spaltung ohne Carboxymethylierung

24-mer	7,8	4,5	4,5	-2,15	0,7
7-mer	8,0	1,6	1,6	-1,13	0,16

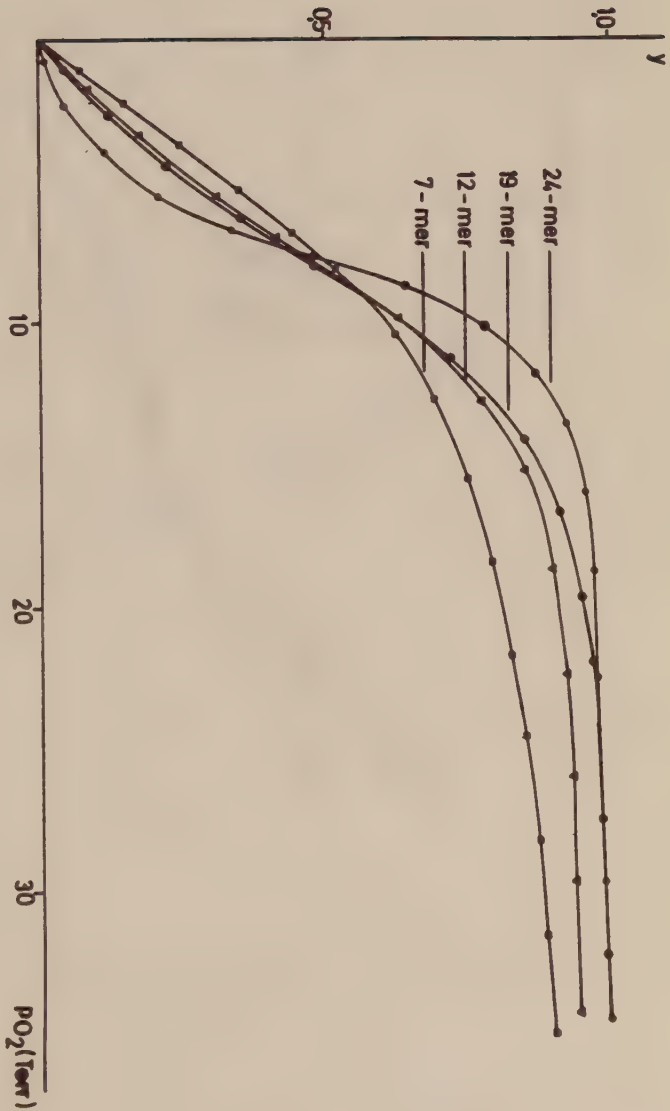
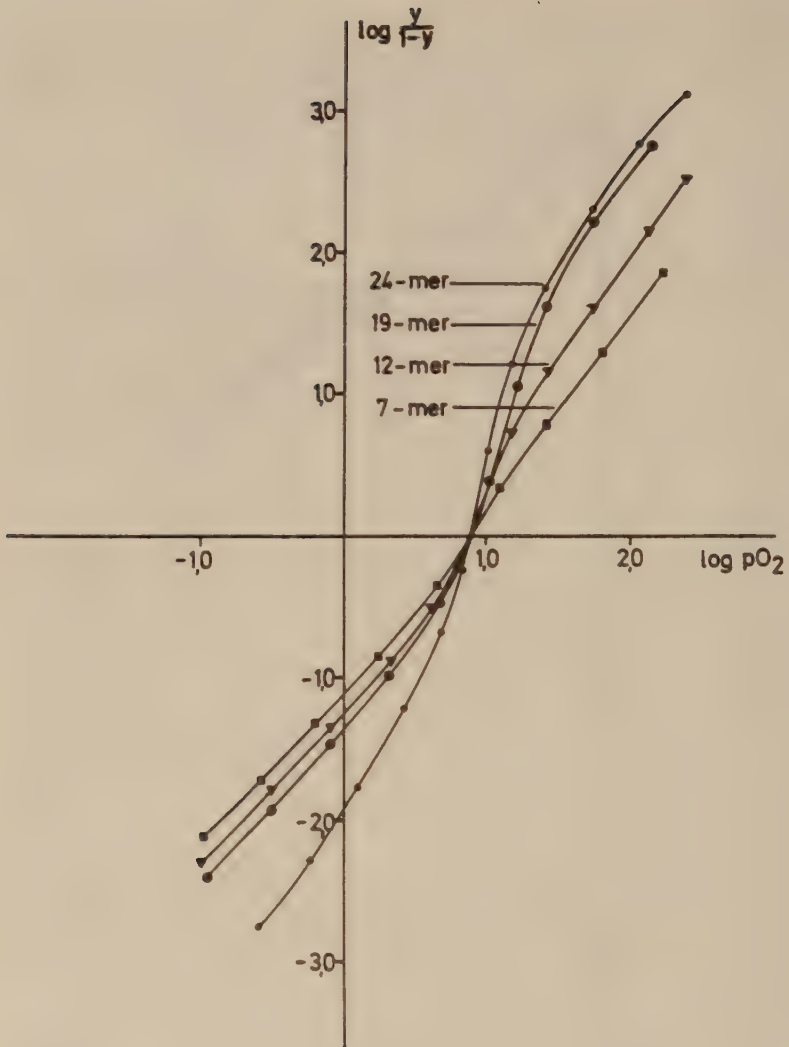


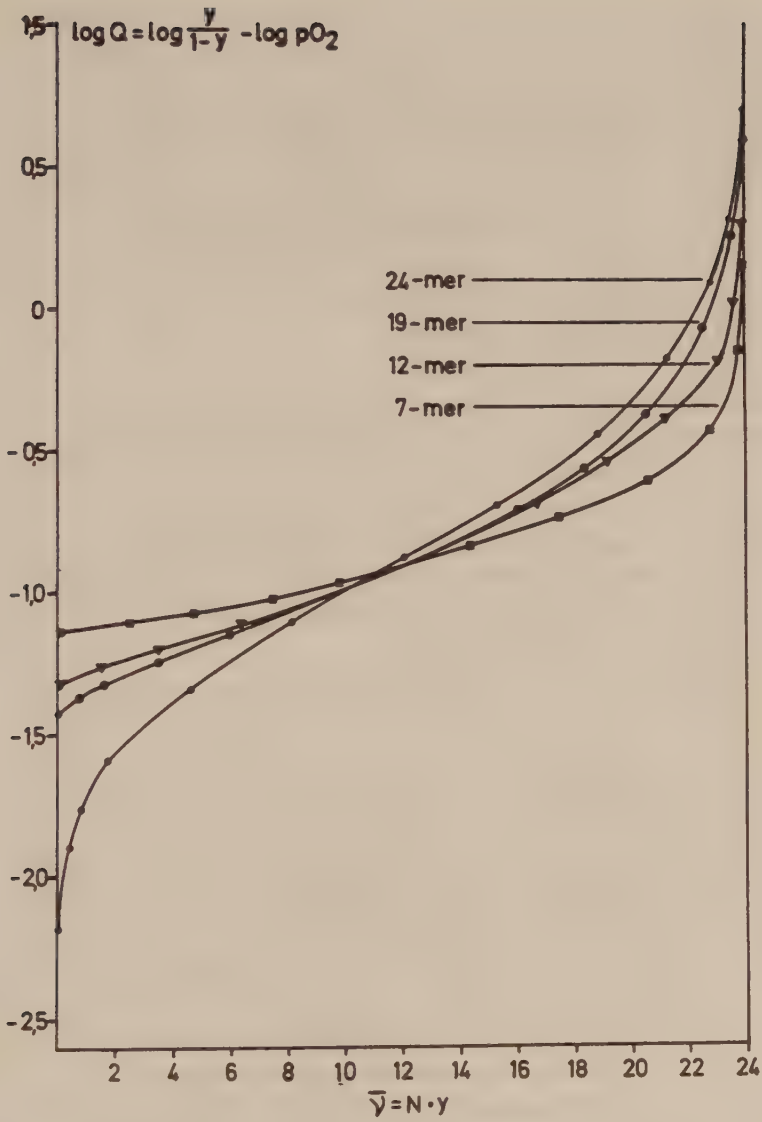
Abbildung 29 a-c:

Sauerstoffbindungskurven des Heptamers, des Dodekamers, des 19-mers und des Kontroll-24-mers sowie ihre Transformation in das Hill- und modifizierte Scatcharddiagramm. Meßbedingungen: 0,1 M Tris/HCl-Puffer pH 8,0, Temperatur 20°C, Proteinkonzentrationen 0,02-0,12 mg/ml.

a) Sauerstoffbindungskurven



b) Hilldiagramm



c) modifiziertes Scatcharddiagramm

was erhöht. Vergleicht man die Ergebnisse der unterschiedlichen Präparationen, so unterscheiden sich zwar die absoluten Kooperativitätswerte (bei hoher Kooperativität des Kontroll-24-mers ist auch die Kooperativität der Zwischenstufen höher), der prozentuale Abfall der Kooperativität vom 24-mer zum 19-mer, zum Dodekamer und zum Heptamer ist jedoch bei allen Präparationen ungefähr gleich.

Abb. 29 zeigt Sauerstoffbindungskurven der verschiedenen Zwischenstufen bei pH 8,0 sowie ihre Transformation in Hill- und Scatcharddiagramme.

Für Sauerstoffbindungskurven bei verschiedenen pH-Werten wurden die pH-Werte durch 1:1 Verdünnung der Proben mit 0,1 M Tris/HCl-Puffern pH 7,0 und 9,0 hergestellt. Drei unabhängige Präparationen, I'12, I'13 und I'14 wurden untersucht. Die Isolierung der Zwischenstufen erfolgte nach DTT-Spaltung durch Herausschneiden der Proteinbanden aus PA-Gelen (System I, pH 7,5). Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 und Abb. 30 zusammengefaßt.

Bei allen Dissoziationszwischenstufen ist der Bohr-Effekt gleichartig vorhanden. Die Affinität zu Sauerstoff ist bei allen Zwischenstufen gleich groß und ist wie auch der Bohr-Effekt unabhängig von der Höhe der Kooperativität. Eine pH-Abhängigkeit der Kooperativität ist beim Kontroll-24-mer, beim 19-mer und zum Teil auch beim Dodekamer vorhanden. Die Kooperativität des Heptamers dagegen ist unabhängig vom pH-Wert. Ein Vergleich zwischen den drei Präparationen I'12 bis I'14 zeigt, daß die pH-Abhängigkeit der Kooperativität um so größer ist, je höher die Kooperativität ist, das heißt, je schonender die Präparation war. So ist die Kooperativität des Dodekamers bei I'12 nicht vom pH-Wert abhängig, während bei I'13 eine deutliche pH-Abhängigkeit vorhanden ist. Über die pH-Abhängigkeit des K_T und des K_R kann keine Aussage gemacht werden, da nicht genug Daten ermittelt werden konnten.

Tabelle 14:
Sauerstoffbindungseigenschaften des Heptamers, des Dodekamers, des 19-mers und des Kontroll-24-mers bei drei pH-Werten. Meßbedingungen: 0,1 M Tris/HCl-Puffer, Temperatur 20°C, Proteinkonzentration zwischen 0,01 und 0,12 mg/ml.

	p ₅₀			n ₅₀			n _{max}			log K _{Tass}			log K _{Rass}			
	pH-Wert	7,7	8,0	8,4	7,7	8,0	8,4	7,7	8,0	8,4	7,7	8,0	8,4	7,7	8,0	8,4
I'12	24-mer	10,0	7,0	4,5	1,6	2,4	2,5	2,1	3,0	3,0	-1,35	-1,4	-1,67	0,6	0,52	0-6
	19-mer*	10,7	7,9	6,6	1,7	2,1	2,2	2,1	2,6	2,6	-1,38	-1,22		0,41	0,34	
	12-mer	10,0	6,6	6,0	1,7	1,6	1,6	1,9	1,7	1,7	-1,24	-0,98	-0,84	0,4	0,24	
	7-mer	10,8	7,4	4,3	1,3	1,2	1,2	1,6	1,4		-1,3	-0,98	-0,66	0,1		0,1
I'13	24-mer	12,6	7,3	6,2	2,3	4,2	4,7	2,7	4,2	4,7	-1,7	-2,17		0		
	12-mer	9,2	6,6	3,0	2,0	2,3	1,7	2,0	2,7	1,8	-1,25	-1,4		0,3	0,24	0,24
	7-mer	11,2	8,3	6,2	1,6	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	-1,33	-1,11		0,1	0,23	0,1
I'14	24-mer	10,4	7,2	3,9	2,5	3,2	3,4	2,8	3,4	3,4	-1,55	-1,68	-1,3			0,6
	19-mer*	11,1	7,9	4,3	2,2	2,5	2,9	2,6	2,5	2,9	-1,5					
	12-mer	11,1	8,1	4,9	1,9	2,1	2,4	2,1	2,1	2,4	-1,45		-1,27			
	7-mer	9,8	9,1	4,9		1,3	1,4		1,3	1,4			-0,75			0

* mit 24-mer verunreinigt

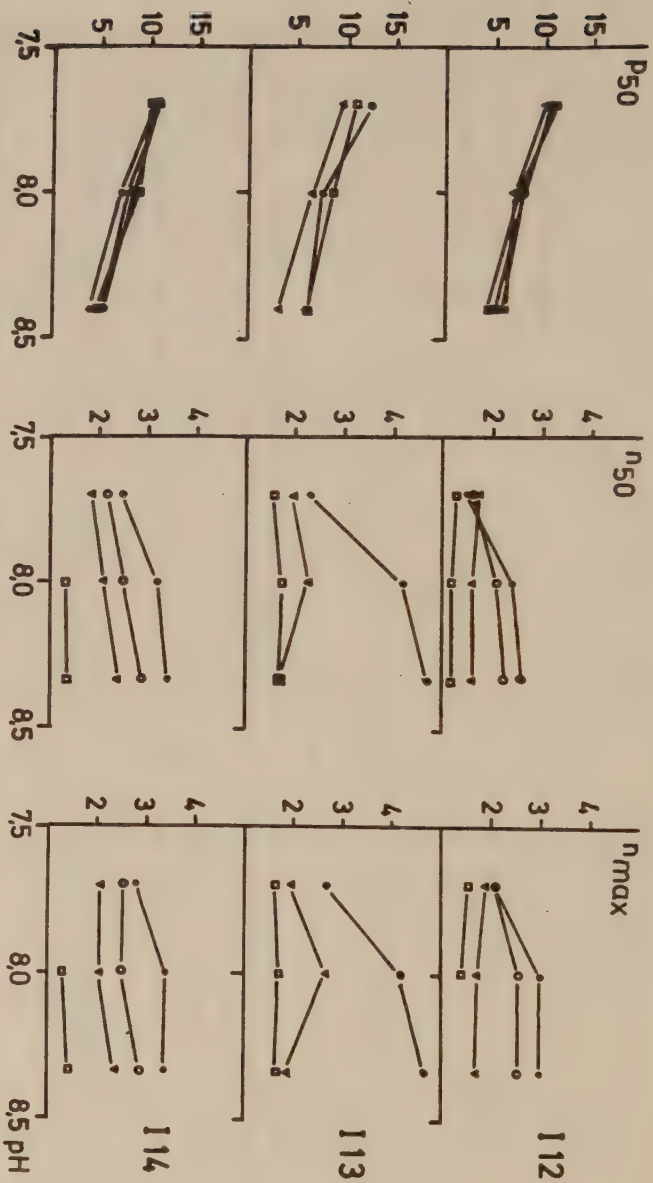


Abbildung 30:
pH-Abhängigkeit des P_{50} , des n_{50} und des n_{max} der Zwischenstufen Heptamer D, Dodekamer ∇ ,
19-mer $\circ$ und des Kontroll-24-mers $\square$. Die Ergebnisse der drei Isolierungen sind einzeln
dargestellt. Messbedingungen siehe Tabelle 14.

c) Zusammenfassung der Sauerstoffbindungsdaten für alle Dissoziationszwischenstufen

Die Ergebnisse der Sauerstoffbindungsstudien an der Dissoziationszwischenstufen lassen folgende Schlußfolgerungen zu:

- Die Affinität zu Sauerstoff ist bei allen Dissoziationszwischenstufen gleich groß (Abb. 31). (Bei den Komponenten, die mit reduzierenden Agenzien behandelt wurden, ist die Affinität etwas höher, jedoch bei allen Zwischenstufen und dem Kontroll-24-mer gleich erhöht.
- Der Bohr-Effekt ist bei allen Zwischenstufen vorhanden. Er ist bei der kleinsten Zwischenstufe, dem Hexamer genauso groß wie beim 24-mer.
- Die "intrinsischen" Assoziationskonstanten $K_{T,ass}$ und $K_{R,ass}$ sind von der Größe der Dissoziationszwischenstufe abhängig (Abb. 31). Die größten Unterschiede bestehen zwischen dem 24-mer und dem 19-mer sowie zwischen dem Dodekamer und dem Heptamer.
- Die Kooperativität ist von der Größe der Zwischenstufe abhängig (Abb. 31). Zur Ausbildung der vollen Kooperativität des 37 S-Hämocyanins sind alle 24 Untereinheiten nötig.

In Tabelle 15 sind noch einmal alle funktionellen Ergebnisse zusammengefaßt. Für die p_{50} -Werte wurden für jede Zwischenstufe Mittelwerte aus allen Präparationen gebildet; desgleichen für $\log K_{T,ass}$ und $\log K_{R,ass}$; für die Kooperativität n_{50} und n_{max} wurden die absoluten Werte der Zwischenstufen in %-Werte der Kooperativität der jeweiligen Kontroll-24-mere (=100%) umgerechnet, wobei $n=1$ 0% Kooperativität bedeutet. Aus diesen %-Werten wurden Mittelwerte gebildet (Abb. 31). Verwendet wurden nur Präparationen, deren Kontroll-24-mer mindestens eine Kooperativität $n_{max} = 3,0$ besaß. Für das 19-mer wurden nur Präparationen verwendet, bei denen die 19-mere Zwischenstufe klar vom 24-mer getrennt war.

Tabelle 15:

Zusammenstellung der funktionellen Ergebnisse für alle Dissoziationsstufen bei pH=8,0; es wurden aus verschiedenen Isolierungen Mittelwerte gebildet (s.u.); Berechnung der Standardabweichung nach: $\sigma_x = \sqrt{\frac{\sum x^2 - (\sum x)^2}{n \cdot (n-1)}}$

Hc-Aggregat	P ₅₀ (PH 8,0)	n ₅₀ (%)	n _{max} (%)	log K _{Tass}	log K _{Rass}
24-mer	9,1±1,8 n=13	100	100	-1,81±0,23 n=15	0,51±0,15 n=10
19-mer	9,0±1,6 n=9	53±12 n=6	52±11 n=6	-1,48±0,23 n=9	0,33±0,04 n=7
12-mer	8,0±0,8 n=6	53±13 n=6	53±10 n=6	-1,28±0,21 n=7	0,29±0,08 n=5
7-mer	8,4±0,7 n=7	20±6 n=5	20±6 n=5	-1,11±0,07 n=6	0,12±0,02 n=5
6-mer	9,5±1,3 n=3	19±/ n=2	21±/ n=2	-1,10±0,19 n=4	0,00±0 n=3

* 10 mM Magnesium + 10 mM Calcium im Meßpuffer

Mittelwerte für P₅₀ aus: 24-mer: I2, I3, I'2, I'3, I'7, I'8, I'9, I'10, I'11, I'12, I'13, I'14. 19-mer: I'1, I'2, I'3, I'4, I'7, I'8, I'9, I'12, I'14. 12-mer: I'7, I'8, I'10, I'12, I'13, I'14. 7-mer: I'7, I'8, I'10, I'12, I'13, I'14. 6-mer: I1, I2, I3.

Mittelwerte für P₅₀ (+10 mM Magnesium + 10 mM Calcium) aus: 24-mer: I'5, I'6, I'8. 19-mer: I'5, I'6, I'8. 12-mer: I'5, I'6, I'8. 7-mer: I'6, I'8.

Mittelwerte für n₅₀ und n_{max} aus: 24-mer=100%. 19-mer: I'1, I'2, I'3, I'4, I'5, I'14. 12-mer: I'5, I'6, I'7, I'8, I'13, I'14. 7-mer: I'7, I'8, I'11, I'13, I'14. 6-mer: I2, I3.

Mittelwerte für log K_{Tass} und log K_{Rass} aus: 24-mer: I2, I3, I'1, I'2, I'3, I'4, I'5, I'6 I'7, I'8, I'9, I'11, I'12, I'13 I'14. 19-mer: I'1, I'2, I'3, I'4, I'5, I'6, I'7, I'8, I'10, I'11, I'13. 7-mer: I'7, I'8, I'11 I'12, I'13. 6-mer: I1, I2, I3.

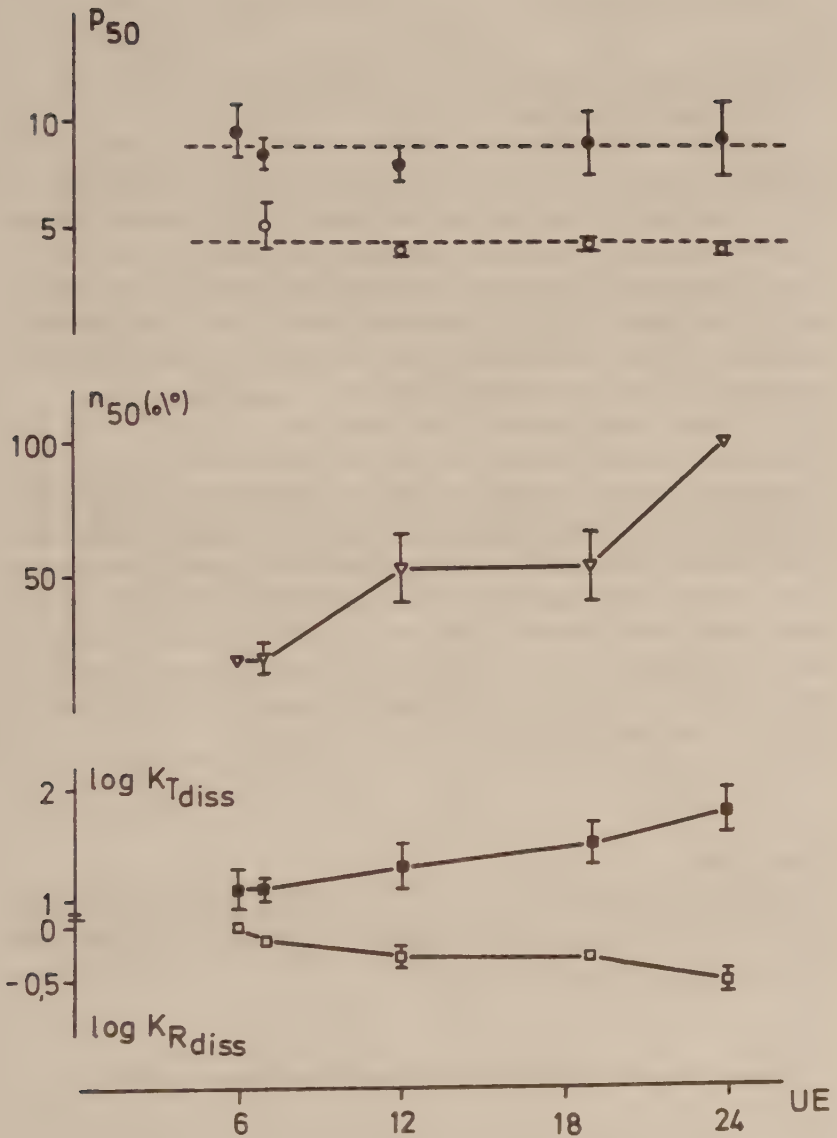


Abbildung 31:
 P_{50} ●, P_{50} (10 mM Mg + 10 mM Ca im Meßpuffer) ○, n_{50} ▽,
 $\log K_{Tdiss}$ ■ und $\log K_{Rdiss}$ □ bei pH 8,0 in Abhängigkeit von
 der Größe der Dissoziationszwischenstufe (Anzahl der UE).

3. Kontrollversuche

a) Sauerstoffbindungsverhalten des 37 S-Hämocyanins nach Carboxymethylierung

Für die Gewinnung des Dodekamers mußte das Spaltgemisch carboxymethyliert werden. Um den Einfluß der Jodessigsäure auf das Sauerstoffbindungsverhalten zu testen, wurde verdünnte Hämolymphe (1mg/ml) mit einem dreifachen Überschuß an Jodessigsäure in 0,1 M NaOH versetzt. (Für die Carboxymethylierung der Dissoziationszwischenstufen eingesetztes Verhältnis: pro mg Hämocyanin 2,25 mg Jodessigsäure in 10 µl NaOH). Das Gemisch blieb eine halbe Stunde bei Raumtemperatur stehen, danach wurde die Jodessigsäure über eine mit Trisacryl gefüllte Säule, die mit 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0 äquilibriert war, abgetrennt. Die Sauerstoffbindungskurven des mit Jodessigsäure behandelten Hämocyanins zeigen außer einer sehr geringen Abnahme der Kooperativität keine Unterschiede zu unbehandeltem Hämocyanin. Das in diesen Proben noch anwesende Begleitprotein stört bei diesen, wie auch bei anderen Versuchen nicht. Tabelle 16 zeigt die Ergebnisse zweier Versuche.

Tabelle 16:

Sauerstoffbindungsdaten von mit Jodessigsäure behandeltem Hämocyanin = Hc* im Gegensatz zu unbehandeltem Hämocyanin = Hc. Als Ausgangsmaterial diente Hämolymphe. Meßbedingungen: 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0, Temperatur 20°C, Proteinkonzentration 0,18 mg/ml.

Probe	P ₅₀	n ₅₀	n _{max}
Hcy	13,5	5,5	6,7
Hcy*	11,5	5,4	5,6
Hcy	12,0	7,3	7,3
Hcy*	11,6	7,0	7,0

b) Sauerstoffbindungsverhalten von aus PA-Gelen eluiertem
37 S-Hämocyanin

Die Isolierung der meisten Zwischenstufen erfolgte durch Herausschneiden der Proteinbanden aus einem PA-Gel mit anschließender Elution des Proteins. Um den Einfluß dieser Isolierungsmethode auf das Hämocyanin zu testen, wurde 37 S-Hämocyanin der PAGE in Gelsystem I, pH 7,5 unterworfen, die 37 S-Bande herausgeschnitten, das Hämocyanin eluiert und das Sauerstoffbindungsverhalten des isolierten 37 S-Hämocyanins überprüft (Ergebnisse Tabelle 17).

Tabelle 17:

Sauerstoffbindungsverhalten von 37 S-Hämocyanin, das durch präparative PAGE in Gelsystem I isoliert wurde = Hc* im Gegensatz zu unbehandeltem 37 S-Hämocyanin = Hc. Meßbedingungen: 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0, Temperatur 20°C, Proteinkonzentration ca. 0,15 mg/ml.

Probe	P ₅₀	n ₅₀	n _{max}
Hc	12,8	4,6	5,0
Hc	13,0	4,7	5,0
Hc*	11,6	4,5	5,1
Hc*	12,9	4,6	4,9

Offenbar hat die PAGE keinen schädigenden Einfluß auf das Hämocyanin.

c) Dissoziation und Reassoziaton des Hexamers

Um der Frage nachzugehen, inwieweit die Untereinheiten in den Dissoziationszwischenstufen geschädigt sind, führte ich folgenden Versuch durch: Hämocyanin wurde über Nacht bei 4°C gegen 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0 + 4 M Harnstoff

dialysiert. Die entstandene hexamere Dissoziationszwischenstufe trennte ich vom verbliebenen 24-mer über eine Biogel A 5m-Säule ab. Die Hexamerenfraktion wurde über Nacht durch Dialyse gegen Glycin/NaOH-Puffer, pH 9,6, $I=0,05$ in Untereinheiten dissoziiert, anschließend 24 Stunden gegen 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0 dialysiert, stark eingeeengt, und die entstandenen Reassoziationsprodukte 24-mer und Hexamer durch Herausschneiden aus einem PA-Gel (Gelsystem I, pH 7,5) isoliert (Abb. 32). Vom Ausgangsmaterial, vom 24-mer und Hexamer nach Harnstoffspaltung, vom Hexamerdissoziat und von den Reassoziationsprodukten 24-mer und Hexamer wurden Sauerstoffbindungskurven gemessen (Tab. 18).

Der Versuch zeigt, daß die Untereinheiten, die aus dem Hexamer stammen, nicht geschädigt sind, ja daß sie in der Lage sind, wieder gut funktionierendes 24-mer aufzubauen.

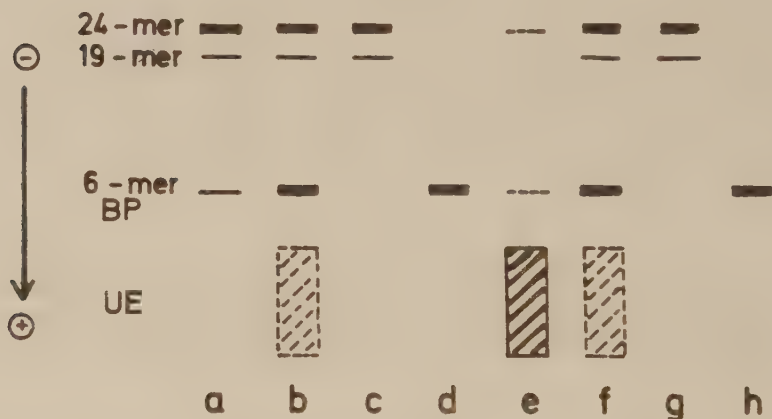


Abbildung 32:

PAGE in Gelsystem I, pH 7,5. a) Hämolymphe, b) Spaltgemisch nach Dialyse der Hämolymphe gegen 4 M Harnstoff enthaltenen 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0, c) und d) nach Gelfiltration mit Biogel A 5m isoliertes 24-mer und Hexamer, e) dissoziiertes Hexamer, f) Reassoziationsprodukte nach Dialyse des Hexamer-Dissoziates gegen 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0, g) und h) nach Herausschneiden aus einem PA-Gel (System I, pH 7,5) isoliertes 24-mer und Hexamer. Aufgetragene Proteinmengen ca. 10-20 μg .

Tabelle 18:

Kontrollversuch zur Frage, ob die Untereinheiten als solche in 4M Harnstoff geschädigt werden (vgl. Text). Meßbedingungen: 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0, Temperatur 20°C, Proteinkonzentration ca. 0,12 mg/ml. Der pH-Wert von 8,0 des Hexamer-Dissoziates wurde durch schlagartige Verdünnung mit 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0 eingestellt, und sofort die Sauerstoffbindungsmessung durchgeführt. Bei einer Konzentration von 0,12 mg/ml erfolgt während der Messung keine Reassoziatio

Versuchsdurchführung und gemessene Präparate	P ₅₀	n ₅₀	n _{max}
Hämolymphe (<u>24-mer</u>)	12,4	6,0	6,0
↓ Dialyse gegen 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0 + 4M Harnstoff			
↓ Isolierung über Biogel A5m			
<u>24-mer</u>	13,1	4,3	4,3
↓ <u>6-mer</u>	9,6	1,5	2,0
↓ Dissoziation durch Dialyse gegen Glycin/OH-Puffer pH 9,6			
<u>6-mer</u> in UE <u>dissoziiert</u>	5,6	1,0	1,0
↓ Reassoziatio			
↓ Isolierung über PAGE			
<u>24-mer</u>	10,5	4,1	5,4
↓ <u>6-mer</u>	9,7	1,5	2,2

C. DIE SAUERSTOFFBINDUNGSEIGENSCHAFTEN VON 37 S-HÄMOCYANIN MIT EINGEBAUTEN MODIFIZIERTEN UNTEREINHEITEN

Eine zentrale Frage ist diejenige nach der Rolle, welche einzelne Untereinheiten bei der Sauerstoffbindung spielen. Im Folgenden wird Hämocyanin untersucht, bei dem in Verbindung von Dissoziation und Reassoziaton eine native Untereinheit gegen eine modifizierte ausgetauscht wurde oder bei dem durch Reaktion mit spezifischen Antikörpern der Konformationsübergang einzelner Untereinheiten behindert wurde. Im ersten Fall hat man den Vorteil, daß mit Sicherheit nicht mehr funktionsfähige Untereinheiten in das Aggregat eingebaut wurden; ein Nachteil ist, daß das Hämocyanin nicht mehr den nativen Zusammenhalt hat, sondern zerlegt und wieder rekonstituiert werden muß, mit allen möglichen schädigenden Einflüssen längerer Manipulationen. Im zweiten Fall arbeitet man zwar mit nativem Hämocyanin, ein großer Nachteil besteht jedoch darin, daß die Besetzung verschiedener Untereinheiten mit ihren Antikörpern quantitativ nicht verglichen werden kann, und daß Antikörper einmal für den Konformationsübergang bedeutsame, ein anderes Mal unwichtige Oberflächenbereiche belegen können.

Zur Verhinderung der Sauerstoffbindung einer Untereinheit gibt es verschiedene Methoden. In der vorliegenden Arbeit wurden apo-Untereinheiten hergestellt, denen mittels Cyanid das Kupfer entzogen wurde. Eine andere Methode wäre zum Beispiel, das Kupferion Cu^+ mit oxidierenden Reagenzien (H_2O_2) zu Cu^{++} zu oxidieren (Methämocyanin).

1. Kopplung untereinheitenspezifischer F(ab)-Fragmente an 37 S-Hämocyanin

Aus spezifischen Antiseren gegen einzelne Untereinheiten wurde mittels Natriumsulfatfällung die Gammaglobulinfrak-

tion gewonnen. Die Gammaglobuline wurden dann mit Papain in F(ab)- und F(c)-Fragmente gespalten. Die Funktionsfähigkeit (Reaktion mit dem Antigen) der F(ab)-Fragmente wurde mittels der "Spot Technik" überprüft.

Mit den spezifischen F(ab)-Fragmenten wurde dann 37 S-Hämocyanin behandelt. Für ein mg 37 S-Hämocyanin wurden zwei mg F(ab) eingesetzt. Da bei der IgG-Fällung die Gesamt-IgG-Fraktion gefällt wurde, also auch IgGs gegen andere Antigene, enthielt jede F(ab)-Lösung auch einen unbekannten Anteil an Fremdspezifitäten und die F(c)-Fragmente. Das genaue Mengenverhältnis zwischen dem 37 S-Hämocyanin und den spezifischen F(ab)-Fragmenten konnte somit nicht bestimmt werden. Die Kopplung der F(ab)-Fragmente an das 37 S-Hämocyanin fand in 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0 bei 37°C statt und dauerte 20 Minuten. Anschließend wurden die Proben über Nacht bei 4°C inkubiert. In sieben Versuchsansätzen wurden für jede Untereinheit F(ab)-Fragmente an 37 S-Hämocyanin gekoppelt. In einem achten Versuchsansatz wurden F(ab)-Fragmente für zwei Untereinheiten, für g und d, gekoppelt. Für diesen Versuch wurden pro mg Hämocyanin vier mg F(ab) eingesetzt.

Die entstandenen F(ab)-Komplexe wurden über präparative TLG von allen anderen Komponenten abgetrennt. Die Ausbeute an gebildeten F(ab)-Komplexen wurde einmal durch die Auswertung von EM-Bildern bestimmt, zum Anderen wurden die isolierten F(ab)-Komplexe einer PAGE in Gelsystem I, pH 7,5 unterworfen. Anhand der Wanderungsstrecken kann auf die Molekülgröße, das bedeutet, auf die relative Menge an gekoppelten F(ab)-Fragmenten geschlossen werden. Abb. 33 zeigt das Elektrophoresemuster aller F(ab)-Komplexe. Diese Methode gibt nur grobe Anhaltspunkte, da nicht nur Anzahl und Ladung, sondern auch die Positionen der F(ab)-Fragmente einen Einfluß auf die Wanderungsgeschwindigkeit des Proteins haben. F(ab)-Fragmente, die sich mehr im Inneren des Moleküls befinden, werden weniger Einfluß auf die Wanderungsgeschwindigkeit haben, als F(ab)-Fragmente, die nach außen wegstehen. Abb. 34 zeigt EM-Bilder der ver-

schiedenen F(ab)-Komplexe. Auch hier ist eine Ausbeutebestimmung nur bedingt möglich, da manche F(ab)-Komplexe schlecht erkennbar sind. Mit beiden Methoden zusammen kann eine ungefähre Abschätzung über die Besetzung der verschiedenen Komplexe mit F(ab)-Fragmenten gemacht werden. In Tabelle 19 wird der aus den oben genannten Methoden geschätzten F(ab)-Besetzungsgrad für jede Untereinheit angegeben. Außerdem wird der Versuch unternommen, den Grad der Wahrscheinlichkeit für die Besetzung jeder Untereinheit mit F(ab)-Fragmenten auszudrücken. Bei mehr im Inneren des Moleküls gelegenen Untereinheiten wird die Wahrscheinlichkeit einer Besetzung mit F(ab)-Fragmenten geringer sein, als bei außen gelegenen Untereinheiten, bei denen eine größere Zahl von antigenen Determinanten exponiert ist. Die Quartärstruktur des 37 S-Hämocyanins war zu diesem Zeitpunkt meiner Arbeit bekannt.

Von allen Komplexen wurden Sauerstoffbindungskurven bei vier verschiedenen pH-Werten gemessen. Die Ergebnisse sind in Tab. 19 und Abb. 35 zusammengefasst. Als Referenz sind die Sauerstoffbindungsdaten für das unbehandelte Hämocyanin angegeben.

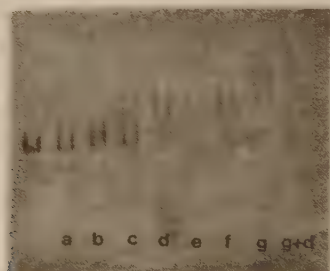


Abbildung 33:

PAGE in Gelsystem I, pH 7,5 der verschiedenen F(ab)-Komplexe des 37 S-Hämocyanins. Links als Referenz 37 S-Hämocyanin. F(ab)-Fragmente an den Untereinheiten (von links nach rechts) a, b, c, d, e, f, g, g+d. Die Ausbildung der "Schmier-spuren" ist wahrscheinlich auf die heterogene Besetzung der 37 S-Moleküle mit F(ab)-Fragmenten und die daraus resultierenden unterschiedlichen Molekülgrößen zurückzuführen. Aufgetragene Proteinmenge ca. 2-5 µg.

Tabelle 19:

Sauerstoffbindungsdaten der F(ab)-Komplexe. Meßbedingungen: Temperatur 20°C, Proteinkonzentration 0,1 mg/ml, 0,1 M Tris/HCl-Puffer, die pH-Werte sind angegeben. Außerdem ist der relative F(ab)-Besetzungsgrad (B) angegeben, der aus der PAGE und aus den EM-Bildern geschätzt werden kann. 4 bedeutet starke Besetzung mit F(ab)-Fragmenten. Die Wahrscheinlichkeit (W) der Reaktion mit F(ab)-Fragmenten wird durch die Werte 1-5 angegeben, wobei bei 5 die Wahrscheinlichkeit am größten ist.

Probe	pH	P ₅₀	n ₅₀	n _{max}	B	W
37 S-Hc	8,0	15,9	4,8	6,8		
+ F(ab) a	7,5	21,4	2,1	2,6	1	2
	7,9	17,4	4,1	6,4		
	8,1	10,5	3,0	4,1		
	8,5	6,9	4,2	5,4		
+ F(ab) b	7,5	16,2	2,2	2,6	1	1
	7,7	13,0	2,9	4,2		
	8,1	9,3	3,1	4,2		
	8,5	4,7	2,6	2,6		
+ F(ab) c	7,5	20,6	2,1	2,7	1,5	1
	7,9	19,9	3,7	3,7		
	8,1	13,3	3,5	4,3		
	8,5	7,0	3,6	3,9		
+ F(ab) d	7,5	18,2	1,6	1,8	2	3
	7,9	17,0	3,6	4,2		
	8,1	11,2	3,1	4,6		
	8,5	9,9	3,8	4,2		
+ F(ab) e	7,5	11,5	1,1	1,5	4	5
	7,9	9,0	1,7	3,4		
	8,1	5,8	1,7	2,7		
	8,5	5,0	1,8	2,9		
+ F(ab) f	7,5	22,1	1,9	2,6	2	4
	7,8	15,1	3,9	5,5		
	8,1	12,3	3,5	3,7		
	8,5	7,5	3,4	4,1		
+ F(ab) g	7,5	21,9	1,9	2,5	3	4,5
	7,9	14,6	3,5	3,8		
	8,1	12,1	3,6	4,8		
	8,5	9,0	2,7	4,7		
+ F(ab) g+d	7,5	18,6	1,7	1,8	4	4,5+3
	8,1	9,5	3,5	3,7		
	8,5	8,1	2,6	3,6		

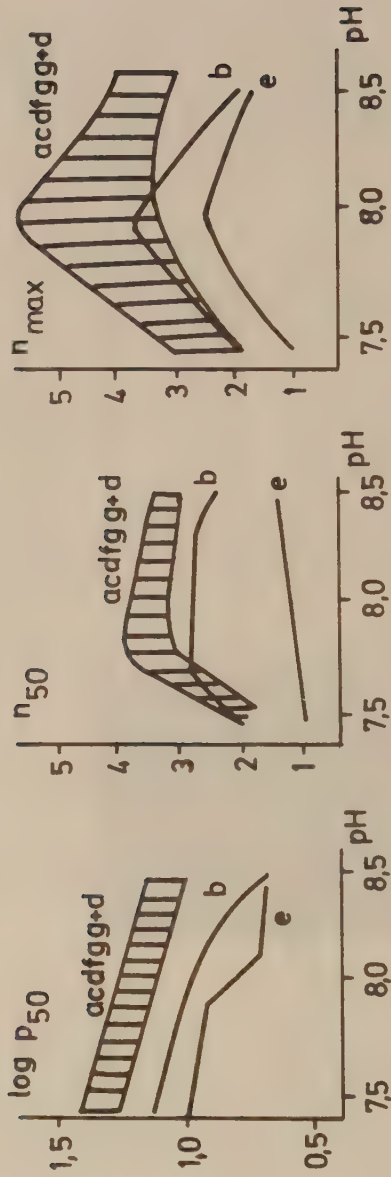


Abbildung 35:
pH-Abhängigkeit des p_{50} , des n_{50} und des $n_{\max}$ der verschiedenen F(ab)-Komplexe. Die Buchstaben geben an, mit welchen Untereinheiten F(ab)-Komplexe gebildet wurden. Meßbedingungen siehe Tabelle 19.

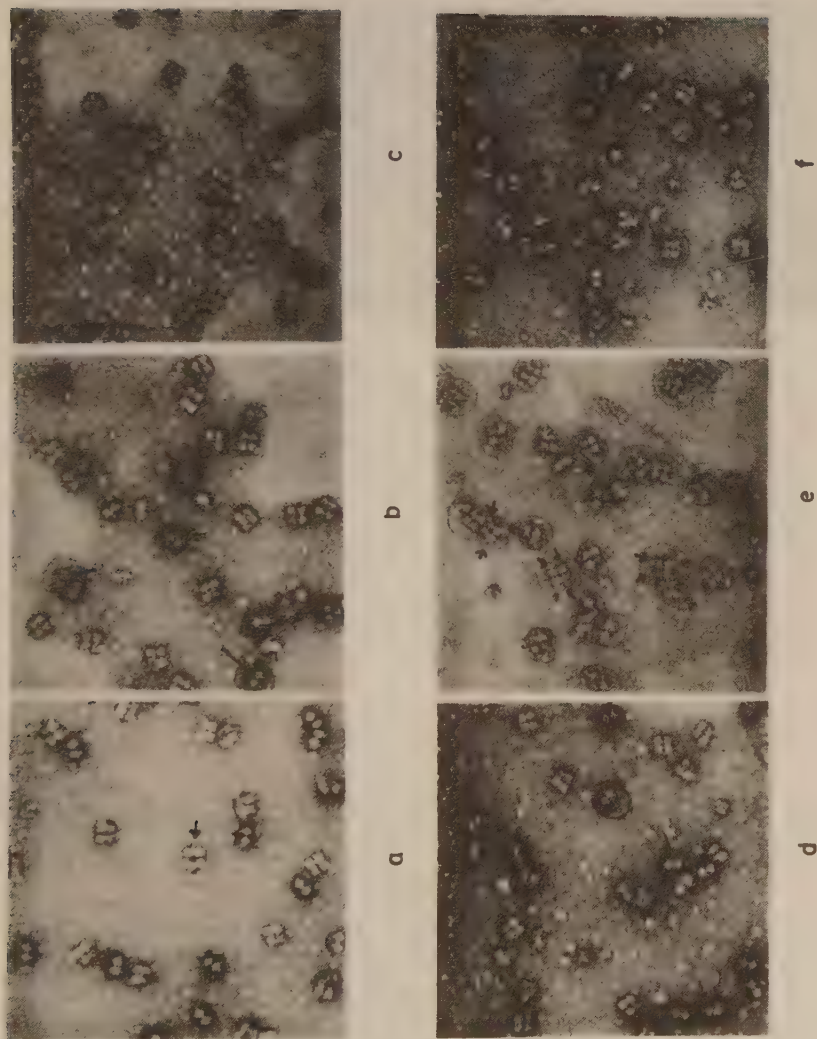
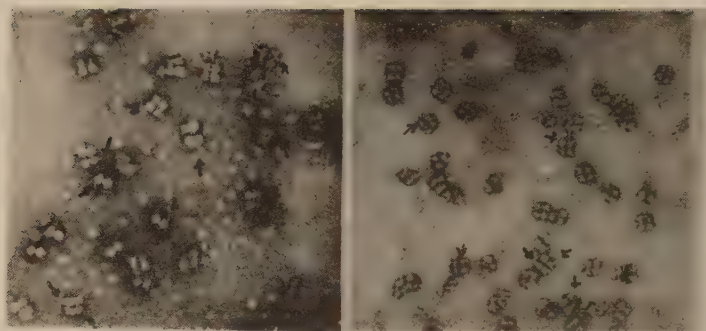


Abbildung 34:
Legende siehe nächste Seite



g

g+d

Abbildung 34:

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von F(ab)-Komplexen des 37 S-Hämocyanins. Komplexe sind mit einem Pfeil versehen. Die Buchstaben unter den Bildern geben an, an welche Untereinheiten F(ab)-Fragmente gebunden wurden.

Aufnahmen: Laboratorium E.F.J.van Bruggen (Groningen).

Aus den Ergebnissen können folgende Schlüsse gezogen werden: Alle F(ab)-Komplexe sind noch kooperativ. Der Bohr-Effekt ist bei allen Komplexen vorhanden. Die Affinität zu Sauerstoff der Komplexe mit F(ab) a,c,d,f und g entspricht bei pH 8,0 der Affinität des Referenzhämocyanins. Bei dem F(ab)-b-Komplex ist die Affinität zu Sauerstoff etwas, beim F(ab)-e-Komplex viel höher. Die Kooperativität der F(ab)-a,c,d,f und g-Komplexe ist stets etwas niedriger als beim Kontroll-37 S-Hämocyanin und vom pH-Wert abhängig. Deutlich niedriger ist die Kooperativität der F(ab)-b-Komplexe, und drastisch erniedrigt ist sie im Falle

der F(ab)-e-Komplexe. Auch die pH-Abhängigkeit der n_{50} und $n_{\max}$ Werte ist für die F(ab)-e-Komplexe gering. Der Wert und die Aussagekraft dieser F(ab)-Versuche werden unten diskutiert werden.

2. Reassoziationsversuche mit apo-Untereinheiten

Im Rahmen dieses Versuchsprogramms sollte aus 37 S-Hämocyanin-Dissoziat spezifisch eine Untereinheit entfernt, diese durch die entsprechende apo-Untereinheit ersetzt, und die Reassoziaton zu 37 S-Hämocyanin durchgeführt werden. Das 37 S-Reassoziat sollte durch Herausschneiden der Proteinbanden aus einem PA-Gel (Gelsystem I, pH 7,5) isoliert und auf seine funktionellen Eigenschaften untersucht werden. Als Kontrolle sollte die entsprechende unbehandelte Untereinheit wieder eingebaut werden. Um die Methoden zur Fällung der Untereinheit, zur Entfernung des Kupfers und zur Reassoziaton zu prüfen, wurden einige Vorversuche durchgeführt.

a) Vorversuche

Fällungsversuche:

Zum Ausfällen einer bestimmten Untereinheit wurden die mittels Natriumsulfat gefällten Gesamt-IgGs aus spezifischen Antiseren für die jeweilige Untereinheit verwendet. Stephan Abel zeigte (1984), daß mit dieser Methode jede Untereinheit quantitativ ausgefällt werden konnte. Ich fällte das Dimer bc aus, indem ich steigende Mengen IgG einsetzte, um genau die Menge IgG zu finden, bei der bc gerade quantitativ ausgefällt wurde (Abb. 36). Die Fällungen fanden bei 37°C statt und dauerten 45 Minuten. Anschließend wurden die Proben zwei Stunden bei 4°C inkubiert. Das Präzipitat wurde bei 12000 g in einer Eppendorfzentrifuge abzentrifugiert. Bei einer Zugabe von 50 μ l

IgG bc zu 50 μ l 37 S-Dissoziat (1 mg/ml) war der für Untereinheit bc spezifische Gipfel in der Immunelektrophorese verschwunden; das bedeutet, Untereinheit bc war quantitativ ausgefällt.

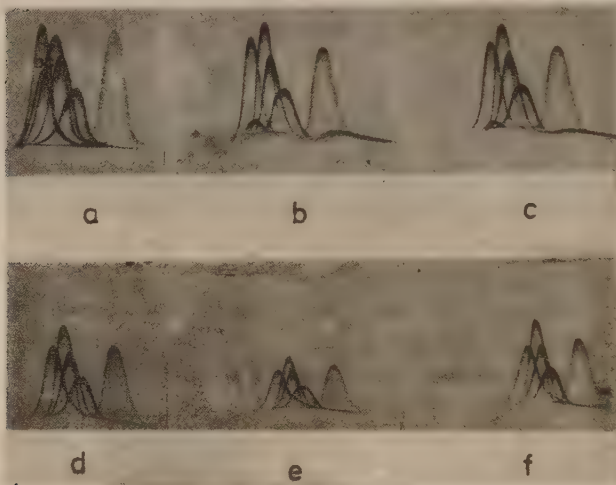


Abbildung 36:

Zweidimensionale Immunelektrophorese von 37 S-Dissoziat und einer Fällungsreihe mit IgG gegen Untereinheit bc. 1. Dimension: je 3,5 μ l von a) 37 S-Dissoziat (1mg/ml), b) 50 μ l 37 S-Dissoziat + 25 μ l IgG bc, c) 50 μ l 37 S-Dissoziat + 35 μ l IgG bc, d) 50 μ l 37 S-Dissoziat + 50 μ l IgG bc, e) 50 μ l 37 S-Dissoziat + 75 μ l IgG bc, f) 50 μ l 37 S-Dissoziat + 100 μ l IgG bc. 2.Dimension: je 100 μ l Antikörper gegen 37 S-Dissoziat.

Versuche zur Entfernung des Kupfers

Durch Behandlung mit Natriumcyanid kann aus nativem Hämocyanin das apo-Hämocyanin hergestellt werden. Nach Nahke (1984) sollte der Kupferverlust des Hämocyanins nach 10-minütigem Einwirken einer 50 mM NaCN-Lösung in Glycin/NaOH-Puffer, pH 9,6, I=0,05 quantitativ sein.

Da die apo-Untereinheiten wieder in das 37 S-Hämocyanin eingebaut werden sollten, mußte die Entfernung des Kupfers so schonend wie möglich sein. Aus diesem Grund führte ich Versuche mit verschiedenen molaren NaCN-Lösungen durch, um die kürzeste Einwirkzeit des NaCN zu finden, bei der alles Kupfer entfernt wurde. In fünf Versuchsansätzen behandelte ich 37 S-Dissoziat (1 mg/ml) mit 10, 20, 30, 40 und 50 mM NaCN-Lösungen in der Art, daß ich zu je 1 ml Hämocyaninlösung 10, 20, 30, 40 und 50 µl einer 1 M NaCN-Lösung zutropfte, kurz schüttelte und das Gemisch sofort auf eine Trisacryl-Entsalzungssäule auftrug. Die Säule war mit Glycin/NaOH-Puffer, pH 9,6 I=0,05 äquilibriert. Der austretende Proteingipfel wurde weiter untersucht. UV-Spektren (Abb. 37) zeigten an Hand des Verschwindens des Gipfels bei 340 nm, der auf den Sauerstoff-Kupfer-Komplex zurückzuführen ist, wie weit das Kupfer entfernt worden war. Ab 40 mM NaCN war der Gipfel bei 340 nm völlig verschwunden. Parallel dazu untersuchte ich die apo-Dissoziate in der zweidimensionalen Immunelektrophorese, um zu überprüfen, wie schonend die Behandlung war. Denaturierte Untereinheiten sind in der Immunelektrophorese als diffuse Gipfel erkennbar. Abb. 37 zeigt, daß die Untereinheiten bis 30 mM NaCN ungeschädigt bleiben, nur über Untereinheit g befand sich ein diffuser Gipfel. Ab 40 mM NaCN wurde auch Untereinheit d leicht denaturiert. Wahrscheinlich würden für manche isolierten Untereinheiten schon geringere NaCN-Konzentrationen ausreichen, um eine vollständige Verhinderung der Sauerstoffbindung herbeizuführen. In jedem Fall scheint eine schonende Entfernung des Kupfers aus den Untereinheiten ohne Denaturierung möglich zu sein.

Reassoziationsversuche

Zur Reassoziaton wurden die verschiedenen Dissoziate 48 Stunden gegen 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,5 bei 4°C dialysiert. Es wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt:

- 1) 37 S-Dissoziat, das mit 40 mM NaCN behandelt worden war. Wie Abb. 38 zeigt, ist eine Reassoziaton zu 37 S-

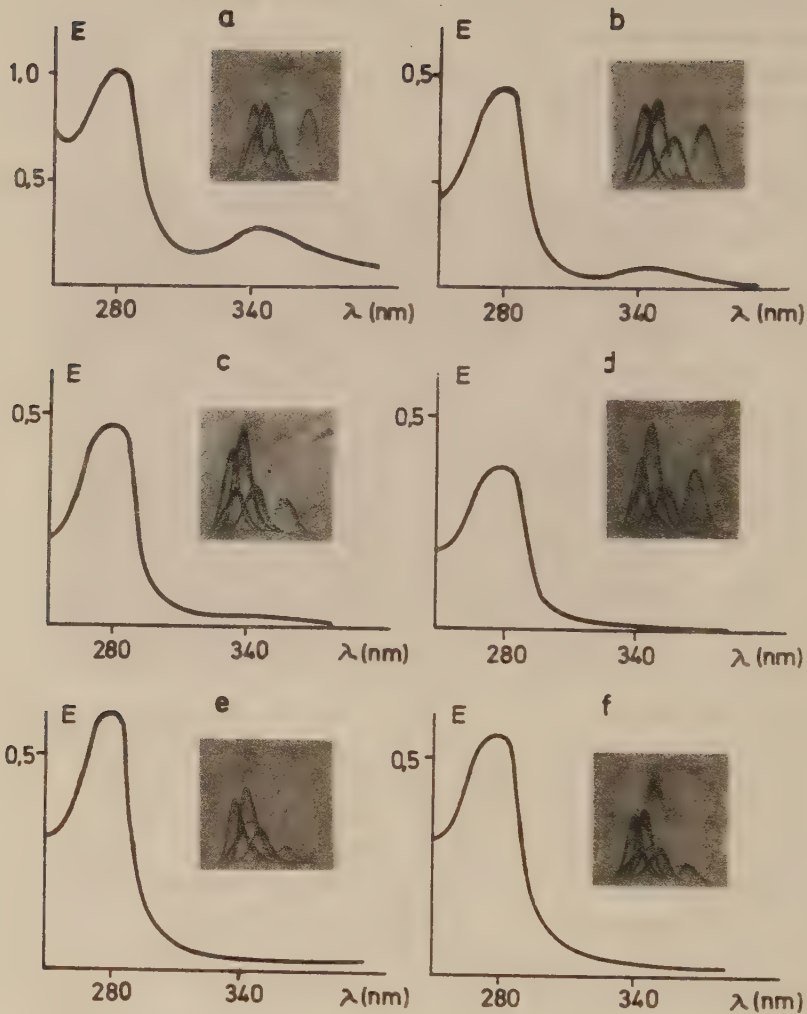


Abbildung 37:

UV-Spektren und Immunelektrophoresemuster von mit unterschiedlichen Mengen NaCN behandeltem Hämolymphe-dissoziat. Zu je 1 ml Dissoziat (1mg/ml) (a) wurden 10 (b), 20 (c), 30 (d), 40 (e) und 50 (f) μ l 1M NaCN-Lösung zugegeben. Puffersystem: Glycin/NaOH pH 9,6, I=0,05. Für die Immunelektrophorese wurden in der ersten Dimension je 3,5 μ l Dissoziat (1mg/ml), in der zweiten Dimension je 100 μ l Antiserum gegen 37 S-Dissoziat eingesetzt.

Hämocyanin möglich.



Abbildung 38:

PAGE in Gelsystem I, pH 7,5, von (links) 37 S-Hämocyanin-Dissoziat, das wieder reassoziert wurde, (rechts) 37 S-Dissoziat, das durch NaCN-Behandlung kupferfrei gemacht, und dann wieder reassoziert wurde.

2) Zu 37 S-Dissoziat, aus dem das Dimer bc durch IgG-Fällung entfernt worden war (s.o.) wurde isoliertes bc-Dimer im Verhältnis Dissoziat ohne Dimer zu bc = 5:1 hinzugegeben und das Gemisch reassoziert. Bei der Überprüfung der Reassoziat im Gelsystem I, pH 7,5 stellte sich heraus, daß die IgGs in der Elektrophorese an der gleichen Stelle wandern, wie die 37 S-Hämocyaninbande.

Da zur Fällung der Untereinheit bc die gesamte IgG-Fraktion eingesetzt worden war, also auch sehr viele IgGs anderer Spezifitäten dabei waren, war ein verschmierter, breiter Streifen auf dem PA-Gel zu erkennen, auf dem sich schwach eine 37 S-Bande abhob. Offensichtlich funktionierte die Reassoziat, die IgGs anderer Spezifitäten störten jedoch. Wie S.Abel (1984) zeigte, können sie nicht abgetrennt werden. Für weitere Versuche wurden daher zur Fällung von Untereinheiten die mittels Affinitätschromatographie gewonnenen spezifischen IgGs verwendet.

Die Voraussetzungen zu einem Programm, bei dem 37 S-Reasso-

ziate mit apo-Untereinheiten hergestellt werden, waren somit gegeben:

- aus allen Untereinheiten kann schonend das Kupfer entfernt werden
- apo-Dissoziat kann wieder reassoziert werden
- einzelne Untereinheiten können aus dem Dissoziat herausgefällt werden
- Dissoziat, bei dem eine Untereinheit herausgefällt und wieder ersetzt wurde, kann wieder reassoziert werden.

b) Hauptversuche: Einbau von Untereinheit apo-e und apo-d

Aus spezifischen Antiseren gegen Untereinheit e wurden mittels Affinitätschromatographie die gegen Untereinheit e spezifischen IgGs isoliert. Leider war die Ausbeute nur sehr gering. Aus 5 ml Antiserum wurden ca. 0,55 mg IgG-e (1,1 ml mit 0,5 o.D.) gewonnen. Die IgGs wurden gegen Glycin/NaOH-Puffer, pH 9,6, I=0,05 dialysiert und in einer Fällungsreihe die Menge an IgG bestimmt, bei der Untereinheit e gerade quantitativ aus dem Hämolymphe-dissoziat ausgefällt wird (Abb. 39). Die Fällungsdauer betrug 45 Minuten bei 37°C und danach zwei Stunden bei 4°C. Das Präzipitat wurde mit einer Eppendorffzentrifuge bei 12000 g abzentrifugiert.

Zum Ausfällen der Untereinheit e wurden für 18 µg Hämolymphe-dissoziat 30 µg IgG e benötigt. Mit der zur Verfügung stehenden IgG e Menge konnte Untereinheit e also aus 0,3 mg Hämolymphe-dissoziat ausgefällt werden.

Ein ml isolierte Untereinheit e (0,6 mg/ml) (für die Isolierung danke ich Frau Feldmaier-Fuchs) wurde gegen Glycin/NaOH-Puffer, pH 9,6, I=0,05 dialysiert und mit 20 µl einer 1 M NaCN-Lösung behandelt. Abb. 40 zeigt UV-Spektren der unbehandelten Untereinheit e und der apo-Untereinheit e. Das Verschwinden des Gipfels bei 340 nm bei apo-e zeigt, daß keine Sauerstoffbindung mehr erfolgte.

Das Hämolymphe-dissoziat ohne Untereinheit e (ca. 0,25 mg)

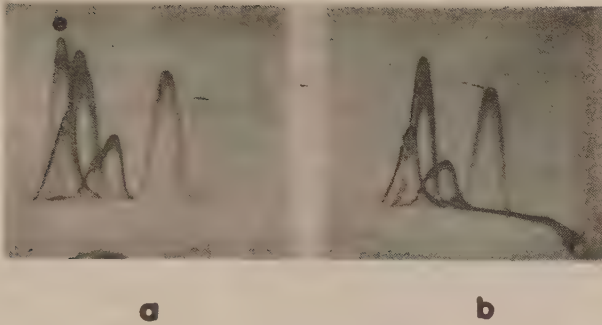


Abbildung 39:

Zweidimensionale Immunelektrophorese von a) Hämolymphe-Dissoziat und b) Hämolymphe-Dissoziat ohne Untereinheit e.

1.Dimension: a) 1 μ l Hämolymphe-Dissoziat (1,2 mg/ml), b) 4 μ l einer Lösung, aus der Untereinheit e in 15 μ l Hämolymphe-Dissoziat mit 60 μ l IgG gegen Untereinheit e (o.D.=0,5) ausgefällt wurde. 2.Dimension: je 50 μ l Antiserum gegen 37 S-Hämocyanin-Dissoziat.

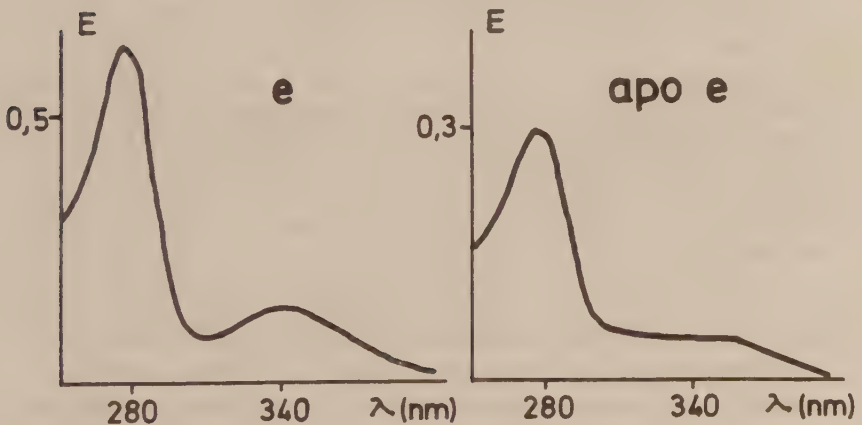


Abbildung 40:

UV-Spektren von Untereinheit e (0,6 mg/ml) und Untereinheit apo e (0,3 mg/ml). Der Knick bei 350 nm im UV-Spektrum von apo e ist auf einen Eichfehler beim Photometer zurückzuführen.

wurde in zwei Teile geteilt. Zu dem einen Teil wurden 50 μg isolierte Untereinheit e, zu dem anderen Teil 50 μg apo-e hinzugefügt. Beide Gemische wurden zwei Tage bei 4°C gegen 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,5 dialysiert. Abb. 41 zeigt die entstandenen Reassoziationsprodukte in der PAGE.

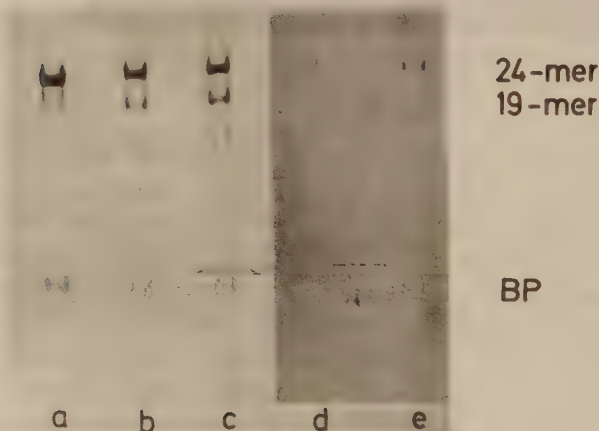


Abbildung 41:

PAGE in Gelsystem I, pH 7,5, von a) Hämolymphe, b) und c) Hämolymphe-dissoziat, aus dem Untereinheit e herausgefällt worden war und das nach Zugabe von b) Untereinheit e und c) apo e reassoziert wurde. Aufgetragene Proteinmenge 5-10 μg . d) isoliertes 37 S-Reassoziat mit Untereinheit e; e) isoliertes 37 S-Reassoziat mit Untereinheit apo e; aufgetragene Proteinmenge 0,2 μg .

In beiden Fällen ist ungefähr gleich viel 37 S-Hämocyanin gebildet worden; das bedeutet, daß Untereinheit apo-e genauso gut eingebaut worden ist, wie Untereinheit e. Beide Reassoziat wurden durch Dialyse gegen 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,5, der mit PEG gesättigt war, auf ca. 100 μl eingengt. Die Isolierung des reassozierten 37 S-Hämocyanins erfolgte durch Herausschneiden der Proteinbanden aus einem PA-Gel (Gelsystem I, pH 7,5). Da die verfügbaren Proteinmengen sehr gering waren, und da für die präpara-

tive PAGE normalerweise 3-4 mg Protein eingesetzt werden müssen, wandelte ich die Isolierungsmethode etwas ab. Anstatt die Proteinlösung auf die gesamte Geloberfläche aufzutragen, verwendete ich einen Kamm mit sechs großen Ausschnitten. In den beiden mittleren Ausschnitten wurde einerseits das Reassoziat mit Untereinheit e, andererseits das Reassoziat mit Untereinheit apo-e aufgetragen. Um bei der Identifizierung der Proteinbanden keine Verluste zu haben, wurde in den Ausschnitten rechts und links der Reassoziat-Hämolymphe aufgetragen. Diese Streifen wurden dann herausgeschnitten und angefärbt. Auf der Höhe der 37 S-Banden sollte sich auch das reassozierte 37 S-Hämocyanin befinden. Es wurde herausgeschnitten, und das Protein mit 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0 oder 7,5 eluiert. Abb. 41 zeigt das Ergebnis. Es gelang also in beiden Fällen, reassoziertes 37 S-Hämocyanin zu isolieren. Allerdings waren die Proteinkonzentrationen außerordentlich gering. Schätzungsweise lagen sie zwischen 0,005 und 0,009 mg/ml. Die gleiche Versuchsreihe wurde auch mit Untereinheit apo-d durchgeführt. Leider konnte nur das apo-d-Reassoziat isoliert werden, das direkte Referenzreassoziat ging durch einen technischen Fehler verloren. Die Affinität zu Sauerstoff entsprach der Affinität des apo-e-Reassoziates, n_{50} und n_{max} waren etwas höher (Tab. 20).

Tabelle 20:

Sauerstoffbindungsdaten des mit Untereinheit e und apo e bzw. apo d reassozierten 37 S-Hämocyanins; drei unabhängige Präparationen; Meßbedingungen: Temperatur 20°C, 0,1 M Tris/HCl-Puffer, Proteinkonzentration ca. 0,002-0,009 mg/ml.

Reassoziat mit UE:	pH	p_{50}	n_{50}	n_{max}
e	8,0	14,3	4,1	4,1
apo e	8,0	13,3	2,9	2,9
e	7,5	22,9	2,5	2,8
apo e	7,5	21,5	2,0	2,1
apo d	7,5	19,3	2,3	2,6

Mit der fluorometrischen Methode konnten trotz der geringen Proteinkonzentrationen Sauerstoffbindungskurven gemessen werden, und n_{50} , $n_{\max}$ und p_{50} bestimmt werden. In Tab. 20 sind die Sauerstoffbindungsdaten von zwei unabhängigen Präparationen zusammengestellt. Es konnte nur jeweils eine Sauerstoffbindungskurve gemessen werden.

Von den isolierten reassozierten 37 S-Hämocyaninen wurden EM-Bilder angefertigt, um festzustellen, ob sich normale 37 S-Moleküle gebildet haben, oder ob vielleicht beim Einbau von apo-e irreguläre "Misfits" gebildet wurden (Abb. 42).

Sowohl mit Untereinheit e als auch mit Untereinheit apo-e entstehen reguläre 37 S-Moleküle. Die Sauerstoffbindungsdaten zeigen, daß sich die apo-Reassoziante in Bezug auf den p_{50} nicht von den normalen Reassoziaten unterscheiden, daß aber die Kooperativitäten n_{50} und $n_{\max}$ bei den apo-Reassoziaten signifikant niedriger sind.

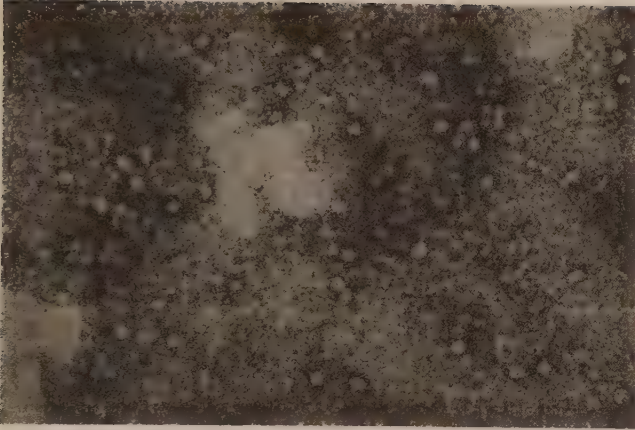
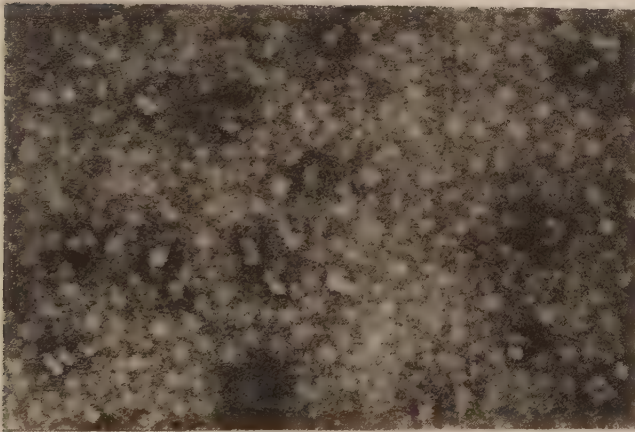
**a****b**

Abbildung 42:
EM-Bilder von reassoziertem 37 S-Hämocyanin a) mit Untereinheit e, b) mit Untereinheit apo e. Primärvergrößerung 3x60000. Aufnahmen: Laboratorium E.F.J. van Bruggen (Groningen).

D. SAUERSTOFFBINDUNGSKURVEN DES NATIVEN 37 S-HÄMOCYANINS

Bei den Versuchen zur Gewinnung der dodekameren Dissoziationszwischenstufe wurde das Hämocyanin auf pH 4,6, also unter den IEP dialysiert. Es war daher interessant, das Sauerstoffbindungsverhalten von nativem 37 S-Hämocyanin unter diesen Bedingungen zu untersuchen. Ebenso sollte auch der Einfluß von 10 mM Calcium und 10 mM Magnesium untersucht werden, da einige Zwischenstufen bei Anwesenheit von 10 mM Calcium und 10 mM Magnesium hergestellt und funktionell untersucht wurden. Besonders interessant war in diesem Zusammenhang die Frage nach einer eventuell stabilisierenden Wirkung von Calcium und Magnesium, die sich auf die Kooperativität des 37 S-Moleküls auswirken könnte.

1. Sauerstoffbindungsverhalten von Hämocyanin im Bereich und unterhalb des isoelektrischen Punktes

Alle Versuche wurden mit frischer Hämolymphe durchgeführt. Die Hämolymphe wurde mit 0,2 M Essigsäure/Natriumacetat-Puffern, pH 4,0, 4,5, 5,0 und 5,5 auf eine Konzentration von 0,12 mg/ml verdünnt. Das Sauerstoffbindungsverhalten wurde mittels der fluorometrischen Methode gemessen. In Tabelle 21 und Abb. 43 sind die Ergebnisse zusammengestellt. Als Vergleichswerte sind p_{50} und Kooperativität bei pH 6,0, 6,5, 7,0 und 8,0 aufgeführt (Tris/HCl-Puffer, 0,1 M). Die Affinität zu Sauerstoff nimmt unterhalb pH 6,0 mit abnehmenden pH-Werten stark zu; das bedeutet, es liegt ein umgekehrter Bohreffekt vor, der einen maximalen Wert mit $\Delta \log p_{50} / \Delta \text{pH} = 1,1$ zwischen pH 6,0 und 5,5 erreicht (Abb 43). Größenordnungsmäßig entspricht dies dem normalen Bohreffekt zwischen pH 8,0 und 8,5. Zwischen pH 6,0 und 7,0 liegt offenbar ein "plateauartiges" Affinitätsminimum vor. Unterhalb des isoelektrischen Punktes ist die Affinität zu Sauerstoff sehr hoch. Die Kooperativität

des Hämocyanins entspricht bei pH 6,5 und 6,0 etwa der Kooperativität bei pH 7,0. Mit fallenden pH-Werten in den Acetatpuffern nimmt die Kooperativität ab, bei pH 4,0 ist keine Kooperativität mehr vorhanden. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, daß das 37 S-Hämocyanin bei pH 4,0 zum Teil dissoziiert vorliegt, während jedoch bei pH 4,5 mit Sicherheit keine Dissoziation in Monomere erfolgt (Überprüfung in der analytischen Ultrazentrifuge). Versuche mit 0,1 M Tris/HCl-Puffern, pH 8,0 + 0,2 M NaAc zeigen, daß Acetat keinen Einfluß auf das Sauerstoffbindungsverhalten von 37 S-Hämocyanin hat, da p_{50} und Kooperativität den Werten für 0,1 M Tris/HCl-Puffer ohne Acetat entsprechen (Tab. 21).

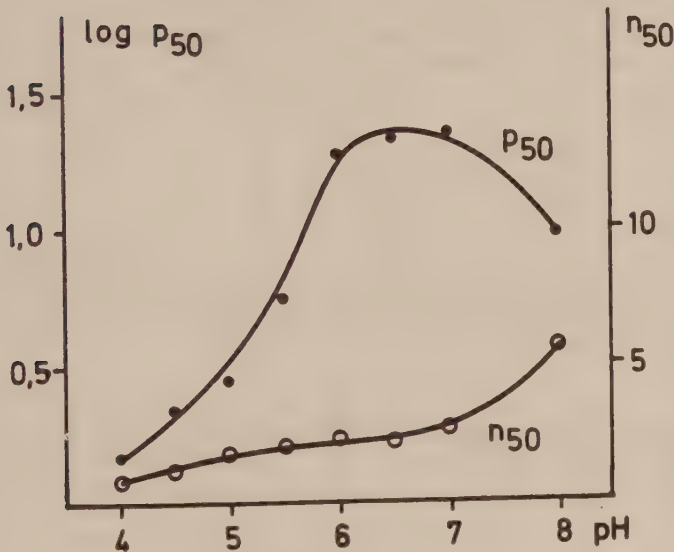


Abbildung 43:

Bohreffekt und Kooperativität des 37 S-Hämocyanins zwischen pH 4,0 und 8,0. $\Delta \log p_{50} / \Delta \text{pH} = 1,1$ zwischen pH 6,0 und 5,5. Meßbedingungen und Puffersysteme siehe Tabelle 21:

Tabelle 21:

Sauerstoffbindungsdaten des 37 S-Hämocyanins im Bereich und unterhalb des IPs: Temperatur 20°C, Proteinkonzentration 0,12 mg/ml, 0,1 M Tris/HCl-Puffer für pH 8,0, 7,0, 6,5 und 6,0; 0,2 M HAC/NaAc-Puffer für pH 5,5, 5,0, 4,5 und 4,0. Für pH 6,0 und 6,5 wurde der pH-Wert nach der Messung überprüft. Es wurden meistens Mittelwerte aus je zwei Messungen gebildet. In Klammern sind die Einzelwerte angegeben.

pH	Puffersystem	p ₅₀	log p ₅₀	n ₅₀	n _{max}
4,0	0,2 M HAC/NaAc	1,5 (1,2/1,8)	0,176	1,0 (0,9/1,1)	1,0 (0,9/1,1)
4,5		2,2 (2,3/2,1)	0,342	1,2 (1,2/1,2)	1,2 (1,2/1,2)
5,0		2,8 (2,8/2,8)	0,447	1,9 (1,9/1,9)	1,9 (1,9/1,9)
5,5		5,8 (6,5/5,1)	0,763	2,1 (2,1/2,1)	2,3 (2,3/2,3)
6,0	0,1 M Tris/HCl	20,0 (20,0/20,0)	1,301	2,4 (2,4/2,4)	2,4 (2,4/2,4)
6,5		21,5 (23,5/19,5)	1,332	2,2 (2,1/2,3)	2,4 (2,4/2,4)
7,0		22,5 (24,8/20,2)	1,350	2,7	2,7
8,0		10,5	1,020	5,7	6,2
8,0	0,1 M Tris/HCl	10,7	1,03	7,2	7,2
8,0	0,1 M Tris/HCl + 0,2 M NaAc	12,3	1,09	6,5	6,5

2. Einfluß von 10 mM Calcium und 10 mM Magnesium auf das Sauerstoffbindungsverhalten von 37 S-Hämocyanin

Die Kooperativität der Dissoziationszwischenstufen ist in Gegenwart von 10 mM Calcium und 10 mM Magnesium höher, als in Tris/HCl-Puffern ohne Calcium und Magnesium. Auf Grund dieser Ergebnisse untersuchte ich den Einfluß von 10 mM Calcium und Magnesium auf das Sauerstoffbindungsverhalten von nativem 37 S-Hämocyanin. Für alle Versuche wurde Hämolymphe mit einer Proteinkonzentration von 0,18 mg/ml verwendet. Vergleichend untersucht wurde a) frische Hämolymphe mit einer hohen Kooperativität des 37 S-Hämocyanins, b) frische Hämolymphe mit niedriger Kooperativität des Hämocyanins und c) gealtertes Hämocyanin. Des Weiteren untersuchte ich den Einfluß der Meßdauer auf die Kooperativität. Alle Versuche wurden in 0,1 M Tris/HCl-Puffern, pH 8,0 bei 20°C, mit oder ohne 10 mM Calcium und Magnesium durchgeführt. Calcium und Magnesium wurden als Chloride zugegeben. Die Sauerstoffbindungskurven wurden mit der fluorometrischen Methode gemessen. Die Ergebnisse sind in Tab. 22 und Tab. 23 zusammengefaßt.

Tabelle 22:

Einfluß von 10 mM Calcium und 10 mM Magnesium auf die Sauerstoffbindungsdaten verschiedener Hämocyaninpräparationen (Einzelversuche). Versuchsbedingungen s. Text.

Probe	10 mM Ca 10 mM mg	P ₅₀	n ₅₀	n _{max}
frische Hämolymphe	-	18,6	7,2	7,2
"	+	6,7	7,0	7,0
"	-	18,3	5,8	5,8
"	+	7,5	6,7	6,7
"	-	20,0	5,0	5,0
"	+	8,7	6,4	6,4
20 Tage alte Hämolymphe	-	17,4	4,4	5,3
"	+	8,7	6,4	6,4

Tabelle 23:

Einfluß der Meßdauer auf die Sauerstoffbindung zweier Häemocyaninpräparationen; Einfluß von 10 mM Magnesium + 10 mM Calcium; Meßbedingungen s.Text. Unter Meßdauer wird die Zeitspanne vom Beginn der Messung bis zur vollständigen Desoxygenierung verstanden, d.h. die Zeitspanne bis zur Eichung des tatsächlichen Nullpunktes ist nicht mit einbezogen. Die Eichung dauert nochmals ca. 20 Minuten. Die Länge der Meßdauer wurde größtenteils durch die Länge der Oxygenierung, d.h. Eichung des Wertes 100% Sättigung mit O₂ bestimmt.

Probe	10 mM Ca 10 mM Mg	p ₅₀	n ₅₀	n _{max}	Meßdauer (min)
frische Hämolympe	-	20,7	6,7	6,7	20
	-	18,3	5,8	5,8	40
	-	19,7	3,3	3,5	60
	+	7,5	6,7	6,7	50
20 Tage alte Hämolympe	-	17,4	4,4	5,3	30
	-	15,7	2,3	3,8	60
	+	8,3	6,1	6,1	30
	+	7,8	6,7	6,7	60

Die Affinität des Häemocyanins zu Sauerstoff wird durch 10 mM Calcium und 10 mM Magnesium immer stark erhöht. Bei guten Präparationen (n₅₀ zwischen 7 und 8) hat 10 mM Calcium und Magnesium keinen Einfluß auf die Kooperativität. Bei Präparationen mit niedriger Kooperativität oder bei gealtertem Material erhöht ein Zusatz von 10 mM Calcium und Magnesium die Kooperativität erheblich.

Die Meßdauer spielt ebenfalls eine Rolle für die Höhe der Kooperativität; auf den p₅₀ hat sie keinen Einfluß. Vor allem bei gealtertem Material und bei Häemocyanin mit niedriger Kooperativität hat die Meßdauer einen deutlichen Einfluß auf die Kooperativität. Bei guten Präparationen ist dieser "Meßdaureffekt" nur sehr gering.

10 mM Calcium und 10 mM Magnesium im Meßpuffer entschärfen diesen "Meßdaureffekt". Die Kooperativität wird auch bei langer Meßdauer nicht mehr so deutlich erniedrigt. Zu-

sammenfassend kann aus diesen Versuchen geschlossen werden, daß 10 mM Calcium und 10 mM Magnesium im Hinblick auf die Kooperativität eine stabilisierende Wirkung auf gealtertes oder geschädigtes Hämocyanin ausüben. Bei gut funktionierendem Hämocyanin kann die Kooperativität durch 10 mM Calcium und Magnesium nicht weiter verbessert werden.

E. THEORETISCHE BETRACHTUNGEN

Für die Beschreibung des allosterischen Verhaltens von Proteinen gibt es zahlreiche theoretische Modelle (s.S. 3). Am häufigsten wird, besonders für die Beschreibung des Sauerstoffbindungsverhaltens von Hämocyaninen, das MWC-Modell angewendet. Mit Hilfe des "curve fittings" kann man testen, ob Hämocyanine den Sauerstoff im Sinne der MWC-Theorie binden (Brouwer et al., 1978a, Brouwer et al., 1977, Arisaka und van Holde 1979). Eine andere Methode, die Anwendbarkeit des MWC-Modells zu prüfen, besteht in einem von Van Holde vorgeschlagenen Test (Decker et al. 1983). Hierbei wird der Ausdruck für die Sättigungsfunktion (1) umgeformt. Die Sättigungsfunktion nach Monod et al. (1965) lautet:

$$\bar{y} = \frac{\alpha (1+\alpha)^{N-1} + \alpha c L (1+\alpha)^{N-1}}{(1+\alpha)^N + L (1+\alpha)^N} \quad (1)$$

mit $\bar{y}$ = Anteil des mit Sauerstoff beladenen Hämocyanins

$1-\bar{y}$ = Anteil des unbeladenen Hämocyanins

$\alpha = \frac{p_{O_2}}{p_{diss,R}}$ = Ligandenkonzentration, normalisiert mit der Dissoziationskonstanten im R-Zustand

$$c = \frac{K_{diss,R}}{K_{diss,T}} < 1$$

$$L = \frac{T}{R}$$

N = Anzahl der miteinander in Wechselwirkung tretenden Untereinheiten

Durch Einsetzen der Gleichung (1) in Gleichung (2)

$$S = \frac{y}{1-y} \quad (2a) \quad \bar{y} = \frac{S}{1+S} \quad (2b)$$

und durch Umformen und Logarithmieren beider Seiten ergibt sich Gleichung (8) :

$$\frac{S}{1+S} = \frac{\alpha(1+\alpha)^{N-1} + \alpha c L \cdot (1+c\alpha)^{N-1}}{(1+\alpha)^N + L \cdot (1+c\alpha)^N} \quad (3)$$

$$S(1+\alpha)^N + SL \cdot (1+c\alpha)^N = \alpha(1+\alpha)^{N-1} + S\alpha \cdot (1+\alpha)^{N-1} + \alpha c L \cdot (1+c\alpha)^{N-1} + S\alpha c L \cdot (1+c\alpha)^{N-1} \quad (4)$$

$$(1+\alpha)^{N-1} \cdot (S+S\alpha - \alpha - S\alpha) = (1+c\alpha)^{N-1} \cdot (-SL - SL\alpha + c\alpha L + S\alpha c L) \quad (5)$$

$$\frac{S-\alpha}{L \cdot (-S+\alpha c)} = \left(\frac{1+c\alpha}{1+\alpha} \right)^{N-1} \quad (6)$$

$$\frac{1 - \frac{S}{\alpha}}{\frac{S}{\alpha} - c} = \left(\frac{1+c\alpha}{1+\alpha} \right)^{N-1} \cdot L \quad (7)$$

$$\log \frac{1 - \frac{S}{\alpha}}{\frac{S}{\alpha} - c} = (N-1) \cdot \log \frac{1+c\alpha}{1+\alpha} + \log L \quad (8)$$

Wenn nun die Sauerstoffbindung eines respiratorischen Proteins die Voraussetzungen des MWC-Modells erfüllt, sollten die Daten der Sauerstoffbindungskurven in einem Diagramm, in dem $\log \frac{1+c\alpha}{1+\alpha}$ gegen $\log \frac{1-S/\alpha}{S/\alpha - c}$ aufgetragen wird, eine Gerade mit der Steigung (N-1) ergeben.

Einige Eigenschaften von Gleichung (8) müssen diskutiert werden (aus Decker et al., 1983). Die Gleichung kann nicht für den Grenzfall $c=1$, d.h. gleiche Affinitäten für den R- und den T-Zustand, angewendet werden. In diesem Fall würde der Ausdruck $\frac{1-S/\alpha}{S/\alpha - c} = -1$, und der log von -1 ist nicht definiert. Die Gleichung besitzt Polstellen für $S/\alpha = 1$, oder $S/\alpha = c$. Für das MWC-Modell muß jedoch gelten: $c \leq S/\alpha < 1$. Schließlich wird der experimentelle Fehlerbereich sehr groß, wenn $\alpha \rightarrow 0$ ($\bar{y} \rightarrow 0$) oder $\alpha \rightarrow \infty$ ($\bar{y} \rightarrow 1$) gehen. Zwischen 10% und 90% Sättigung sind die Kurven jedoch gut auswertbar.

Im folgenden Teil der Arbeit werden Sauerstoffbindungskurven des nativen 37 S-Hämocyansins von *Eurypelma californicum* sowie Sauerstoffbindungskurven der Dissoziationszwischenstufen mit Hilfe des "van Holde-Diagramms" ausgewertet, um zu überprüfen, inwieweit die allosterische Wechselwirkung der Untereinheiten im Sinne des MWC- Modells erklärt werden kann.

Die Konstanten $K_{diss,R}$ und $K_{diss,T}$ wurden aus einem modifizierten Scatchard-Diagramm (Edsall et al., 1954, Loewe 1978) ermittelt. Die Anzahl der in Wechselwirkung stehenden Untereinheiten (N) wird aus der Steigung der Kurven im "van Holde-Diagramm" bei Halbsättigung bestimmt.

Die Sauerstoffbindungskurven wurden mit Hilfe eines Computerprogramms (Decker 1981) in das "van Holde-Diagramm" transformiert.

1. Natives 37 S-Hämocyanin

In Tabelle 24 sind die Sauerstoffbindungsdaten von nativem 37 S-Hämocyanin bei fünf unterschiedlichen pH-Werten zusammengestellt. Abb. 44 zeigt das "van Holde-Diagramm" der fünf Sauerstoffbindungskurven.

Tabelle 24:

Sauerstoffbindungsdaten von 37 S-Hämocyanin bei fünf verschiedenen pH-Werten. Meßbedingungen s. Abb. 44.

pH	P_{50}	n_{50}	n_{max}	$\log K_{Tass}$	$\log K_{Rass}$	c	N
7,0	34,3	2,4	2,8	-2,5	0,5	0,001	3,5
7,3	28,2	3,1	3,1	-2,5	0,5	0,001	4,2
8,0	13,5	7,6	7,6	-2,5	0,5	0,001	8,4
8,6	5,2	5,7	5,7	-2,5	0,5	0,001	7,9
9,0	3,7	6,2	6,2	-2,5	0,5	0,001	8,0

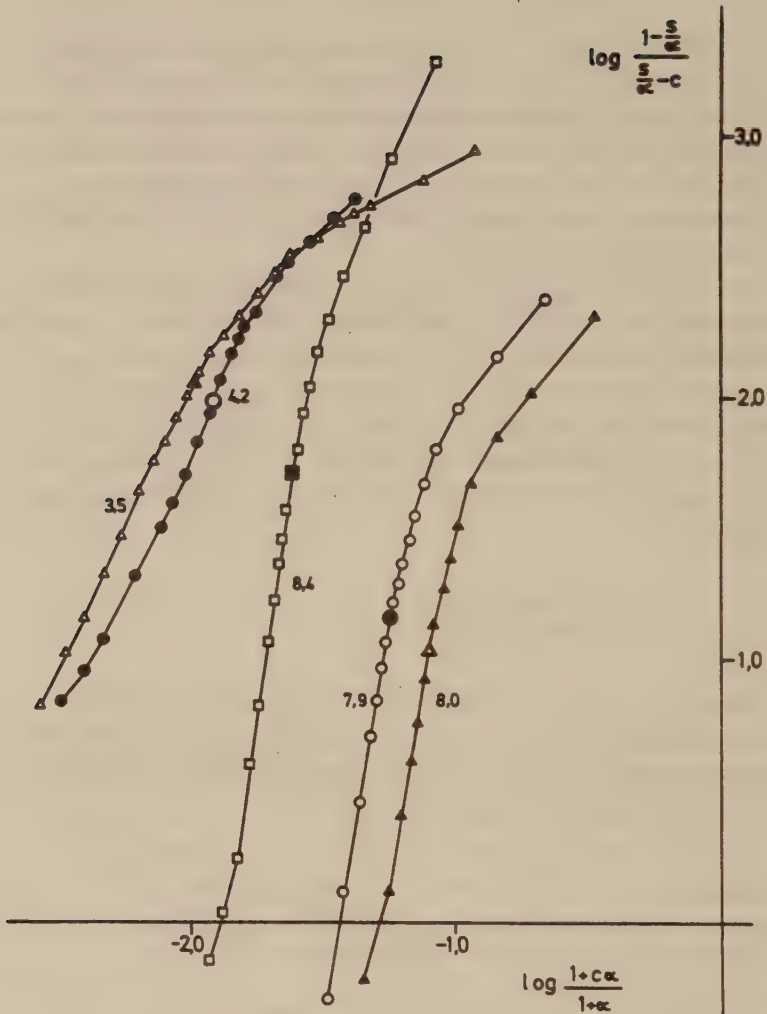


Abbildung 44:

"van Holde Diagramm" von Sauerstoffbindungskurven des 37 S-Hämocyanins in 0,1 M Tris/HCl-Puffern, + 1 mM MgCl_2 + 4 mM CaCl_2 ; Temperatur 20°C, Proteinkonzentration 0,15 mg/ml, pH-Werte von links nach rechts 7,0 Δ , 7,3 $\bullet$, 8,0 $\square$, 8,6 $\circ$, 9,0 $\blacktriangle$. Die Halbsättigung ist durch größere Symbole gekennzeichnet; die Zahl der in Wechselwirkung stehenden Untereinheiten bei Halbsättigung ist angegeben.

Die Transformation der Sauerstoffbindungskurven in den "van Holde-Plot" zeigt, daß die Sauerstoffbindungsfunktion des 37 S-Hämocyanins offenbar nicht mit dem MWC-Modell beschrieben werden kann, da sich keine Geraden ergeben. Teilweise sind gerade Kurvenanteile vorhanden, die durch Knickstellen voneinander abgegrenzt sind. Diese "Knicks" sind besonders gut in der Nähe von pH 7 ausgeprägt. Bei Zahl der in Wechselwirkung stehenden Untereinheiten bei Halbsättigung $N \approx 8$ kann mit keiner strukturellen Einheit (Hexamer, Dodekamer) in Einklang gebracht werden. Die Transformation zahlreicher weiterer Sauerstoffbindungskurven des 37 S-Hämocyanins in das "van Holde-Diagramm" ergibt stets ein ähnliches Bild. Es ergeben sich niemals Geraden, nur gerade Anteile der Kurven. Die maximale Zahl N beträgt immer ca. 8-9.

2. Dissoziationszwischenstufen

Ein völlig anderes Bild als beim 37 S-Hämocyanin ergibt die Transformation der Sauerstoffbindungskurven der hexameren Zwischenstufe in ein "van Holde-Diagramm". Bei verschiedenen pH-Werten ergeben sich stets Geraden, die nur zum Teil ganz leichte Knickstellen aufweisen (Abb. 45). Das würde bedeuten, daß die allosterische Wechselwirkung zwischen den Untereinheiten im Hexamer den Gesetzen des MWC-Modells folgt. Die Zahl N liegt für pH 8,0 bei ca. 5, für pH-Werte größer oder kleiner 8,0 allerdings bei Werten, die größer 6 sind. Dies ist in sich ein Widerspruch, da die Zahl der in Wechselwirkung stehenden Untereinheiten nicht größer sein kann, als die Zahl der Untereinheiten in der Zwischenstufe. Bisher habe ich keine Erklärung dafür.

Die Sauerstoffbindungskurven der Dissoziationszwischenstufen 19-mer, Dodekamer und Heptamer ergeben nach ihrer Transformation in das "van Holde-Diagramm" Kurven, deren

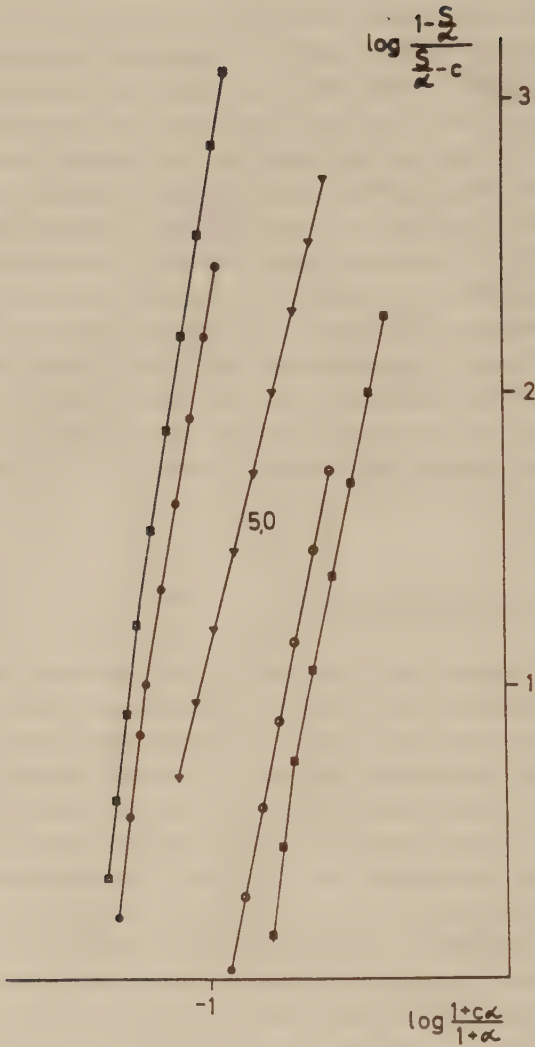


Abbildung 45:

"Van Holde-Diagramm" von Sauerstoffbindungskurven des Hexamers (Präparation I3) bei verschiedenen pH-Werten. 0,1 M Tris/HCl-Puffer, Temperatur 20°C, pH-Werte von links nach rechts: pH 7,0 □, 7,7 •, 8,0 ▽, 8,4 ○, 8,9 ■. Die Anzahl N der in Wechselwirkung tretenden Untereinheiten ist bei: pH 7,0= 7; pH 7,7= 7; pH 8,0= 5; pH 8,4= 7; pH 8,9= 6.

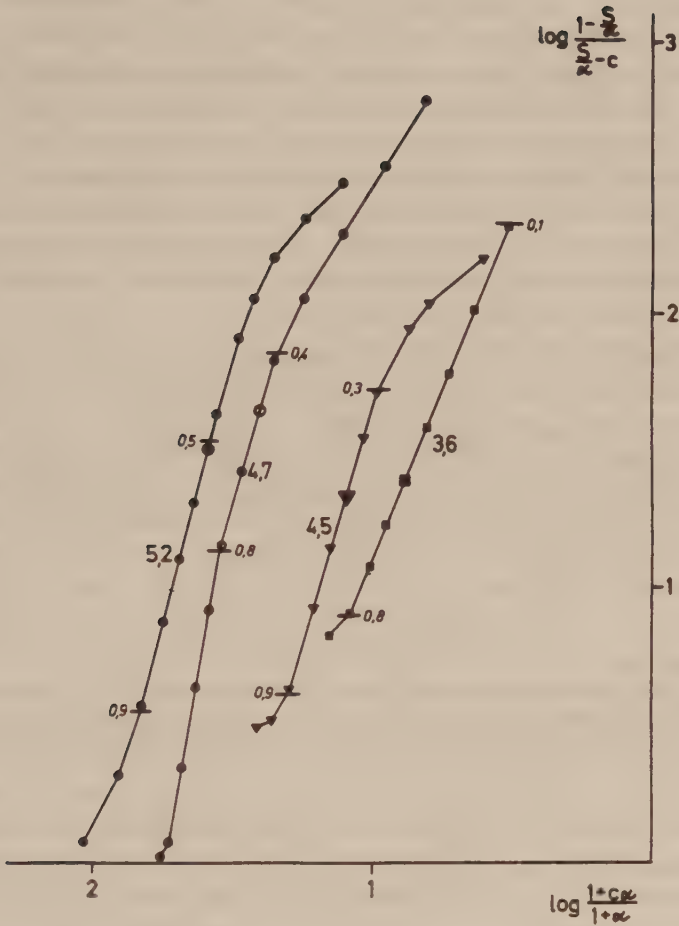


Abbildung 46:

"Van Holde-Diagramm" von Sauerstoffbindungskurven des Heptamers ■, des Dodekamers ▼, des 19-mers ○ und des Kontroll-24-mers ● bei pH 8,0 (Präparationen I'11 und I'8); 0,1 M Tris/HCl-Puffer, Temperatur 20°C. Die Halbsättigung ist durch größere Symbole gekennzeichnet. Die Zahl der in Wechselwirkung stehenden Untereinheiten bei Halbsättigung ist angegeben. Die schräg gedruckten Zahlen geben die Sauerstoffsättigung an.

Geradenanteile mit kleiner werdenden Aggregationsstufen zunehmen. Das Heptamer ergibt von $y=0,1-0,8$ eine Gerade, ähnlich dem Hexamer. Abb. 46 zeigt repräsentative Transformationen von Sauerstoffbindungskurven des Heptamers, des Dodekamers, des 19-mers sowie eines 24-mers als Kontrolle. Die N-Werte bei Halbsättigung liegen für das Kontroll-24-mer bei 5,2, für das 19-mer bei 4,7, für das Dodekamer bei 4,5 und für das Heptamer bei 3,6. Es sind also keine großen Unterschiede vorhanden, zumal der N-Wert für das Hexamer wieder bei 5 liegt (pH 8).

In Tabelle 25 sind die aus dem "van Holde-Diagramm" ablesbaren Daten der Dissoziationszwischenstufen, eines Kontroll-24-mers und eines nativen 24-mers zusammengefasst. Für jeden Aggregationszustand wird angegeben, über welchen Sättigungsbereich sich die Geradenanteile (um den Halbsättigungspunkt) erstrecken.

Tabelle 25:

Anzahl der wechselwirkenden Untereinheiten bei Halbsättigung und Geradenanteile im "van Holde-Diagramm" für die Dissoziationszwischenstufen, ein Kontroll-24-mer und ein natives 24-mer.

Aggregationsstufe	N	Geradenanteil von... bis in % Sättigung
24-mer (nativ)	8,4	ca. 40% - 90%
24-mer (Kontrolle)	5,2	ca. 50% - 90%
19-mer	4,7	ca. 40% - 80%
12-mer	4,5	ca. 30% - 90%
7-mer	3,6	ca. 10% - 80%
6-mer	5,0	ca. 10% - 90%

DISKUSSION

A) DIE QUARTÄRSTRUKTUR DES 37 S-HÄMOCYANINS

Arthropodenhäemocyanine treten als 1- bis 8- Hexamer-Strukturen auf (Van Holde und van Bruggen, 1971). Das 37-S-Hämocyanin von *Eurypelma californicum* setzt sich aus vier Hexameren zusammen. Auf EM-Bildern (Abb.47) ist zwischen je zwei Hexameren ein schmaler Spalt, und zwischen zwei Dodekameren ein breiter Spalt zu erkennen, mit zwei Brücken nahe der Mitte. Bei der alkalischen Dissoziation zerfällt das 37 S-Hämocyanin offenbar nicht schlagartig in seine Untereinheiten, wie man früher angenommen hatte, sondern es entstehen definierte Dissoziationszwischenstufen, die isoliert werden können, sobald der Dissoziationsvorgang unterbrochen wird. Loewe (1972) beschreibt bereits hochmolekulare Dissoziationszwischenstufen (33 S und 27 S). Erstaunlicherweise findet man nicht die auf Grund der im EM erkennbaren Morphologie des Moleküls erwarteten "geraden Zwischenstufen" wie Hexamer und Dodekamer, sondern es bilden sich ungerade Aggregate, wie Heptamer und 19-mer. Nur nach Behandlung des 37 S-Hämocyanins mit 4M Harnstoff oder mit reduzierenden Agenzien. (β -Mercaptoaethanol, DTT) können auch Hexamere und Dodekamere isoliert werden. Aus dem Auftreten bestimmter Zwischenstufen, aus ihrer Zusammensetzung und aus der Morphologie des 37 S-Moleküls können bereits Rückschlüsse auf die Quartärstruktur gezogen werden.

Bei der Untereinheitenzusammensetzung der "ungeraden" Zwischenstufen Heptamer und 19-mer fällt auf, daß sie zusätzlich zu einmal bzw. dreimal den fünf Monomeren a, d, e, f und g das Dimer bc einmal bzw. zweimal besitzen. Bei der auf EM-Bildern (Tab.8) sichtbaren herausstehenden Untereinheit könnte es sich um eine Hälfte des Dimers bc handeln. Das Dimer bc käme damit als Verbindung zwischen den Hexameren in Frage. Dafür spricht auch die Tatsache, daß sich die zusätzliche Untereinheit im 19-mer im Zentrum

des Moleküls befindet (EM-Bild Tab.8, zentraler Ring). Ein weiterer Hinweis für die verbindende Funktion von bc wäre die Entstehung von Hexameren nach Behandlung mit 4M Harnstoff. Mit 4M Harnstoff kann nämlich das Heterodimer bc in die beiden Monomere b und c gespalten werden (Schneider 1978). Bemerkenswert ist die Tatsache, daß mit 4M Harnstoff die Bindung zwischen b und c gespalten wird, das Molekül jedoch nicht in Untereinheiten zerfällt. Das Hämocyanin des Skorpions *Androctonus australis*, welches dem aus *Eurypelma* sehr ähnelt, zerfällt bereits bei Anwesenheit von 1M Harnstoff in die Untereinheiten (Lamy et al., 1979).

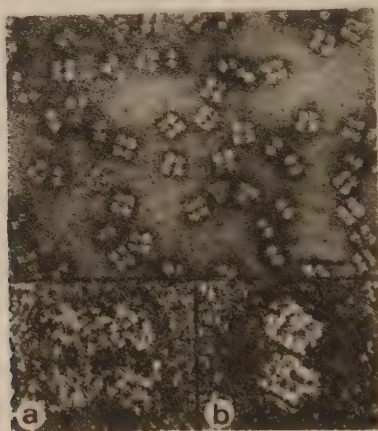


Abbildung 47:
Elektronenmikroskopische Aufnahme von 37 S-Molekülen.
Primärvergrößerung 60000 fach. a) Aufsicht b) Seitenansicht. Herstellung der EM-Bilder siehe S.18.

Stabile Dimere, welche als Verbindung zwischen Hexameren fungieren, kommen bei Arthropodenhämocyaninen häufig vor (Markl et al., 1981 b). Markl fand 1980 bei der Spinne *Cupiennius* in der heptameren Dissoziationszwischenstufe ein über Disulfidbrücken verknüpftes Homodimer, welches

ebenfalls als Verbindung zwischen zwei Hexameren fungiert. Immer wenn stabile Dimere als Verbindung zwischen Hexameren vorkommen, treten als Dissoziationszwischenstufen Heptamere auf.

Welche Untereinheit des Dimers bc im Heptamer heraussteht, konnte nicht festgestellt werden. Theoretisch könnte es zwei Typen von Heptameren geben; einmal mit b und einmal mit c als herausstehender Untereinheit. Entsprechend werden zwei Typen von Hexameren gefordert, eines mit b und eines mit c. Da das c-Hexamer offenbar weniger stabil ist (s.S.38), zerfällt wahrscheinlich auch das c-Heptamer, d.h. das Heptamer, bei dem Untereinheit b heraussteht, leichter.

Einen Hinweis auf die Rolle der Untereinheit f gibt die Spaltung mit β -Mercaptoaethanol. Die Untereinheit f kommt auch als Homodimer ff vor (Schneider et al.,1977), welches mit reduzierenden Reagenzien gespalten werden kann. Da Dodekamere (24 S) nur nach Behandlung des 37 S-Hämocyanins mit reduzierenden Agenzien gebildet werden, liegt eine Beteiligung der Untereinheit f bzw. ff an der Verknüpfung zweier Dodekamere nahe. Untereinheit f müßte dann an den beiden Enden des tiefen Spaltes im 37 S-Molekül liegen, da die Mitte durch bc besetzt ist.

Das Dodekamer enthält genau die Hälfte aller Untereinheiten und somit einmal das Heterodimer bc. Das bedeutet, daß die stabile, nur mit Harnstoff zu spaltende bc-Verbindung jeweils in einem Dodekamer, zwischen den Hexameren liegt. Da auf EM-Bildern nativer 37 S-Moleküle eine Art zentraler Ring sichtbar ist, von dem angenommen wurde, daß es sich um zwei bc handelt, dürfte es auch bc-Bindungen geben, die die beiden Dodekamere verbinden und die leichter zu spalten sind, z.B. durch alkalische Dissoziation. Für einen zentralen bc-Ring sprechen auch die Ergebnisse aus Reassoziationsversuchen mit bc allein, bei denen Tetramere beobachtet wurden (Markl et al.,1982).

Die 16-mere Dissoziationszwischenstufe besitzt außer zwei Hexameren das zweite Dimer bc und die Untereinheiten a und d. Auf EM-Bildern sind Strukturen erkennbar, die die

Vermutung nahe legen, daß a und d nahe an der Verbindung zwischen zwei Hexameren liegen.

Aus diesen Ergebnissen und auf Grund der Erkenntnis, daß die Untereinheiten gleichmäßig auf die Hexamere verteilt sein müssen (s.S. 40), kann ein vorläufiges Modell für die Quartärstruktur des 37 S-Hämocyanins konstruiert werden.

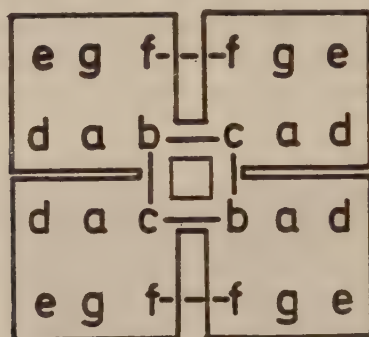


Abbildung 48:

Modell auf Grund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit für die Quartärstruktur des 37 S-Hämocyanins der Vogelspinne *Eurypelma californicum*.

Die Untereinheiten e und g müßten an den Ecken der Hexamere liegen.

Dieses Modell konnte durch die Ergebnisse der Reassoziationsversuche (Markl et al., 1982) und Markierung mit spezifischen Antikörpern (Markl et al., 1981 c) bestätigt und vervollständigt werden. Abb. 49 zeigt das endgültige Modell der Quartärstruktur des 37 S-Hämocyanins.



Abbildung 49:

Modell der Quartärstruktur des 37 S-Hämocyanins aus der Vogelspinne *Eurypelma californicum* auf Grund von elektronenmikroskopischen Untersuchungen. Die nierenartige Form der Untereinheiten (nach van Schaik et al., 1981) wurde zugrunde gelegt. Die Balken geben die vermuteten wichtigen Verbindungen wieder: bc verbindet zwei Hexamere, ff spielt bei der Verbindung zweier Dodekamere eine Rolle (aus Markl et al., 1981 c).

B) ZUR DISSOZIATION DES 37 S-MOLEKÜLS

Je nach Wahl der Reagenzien erfolgt die Dissoziation des 37 S-Moleküls über unterschiedliche Zwischenstufen. Im folgenden Abschnitt wird ein mögliches Dissoziationsschema vorgestellt und diskutiert (Abb. 50).

Das 19-mer wird offenbar sehr leicht gebildet. Es ist in PA-Gelen immer neben dem 24-mer vorhanden und tritt bei jeder Behandlungsmethode als Zwischengstufe auf. Wenn an einer Ecke des 37 S-Moleküls eine Untereinheit abdissoziiert, bricht offenbar das betroffene Hexamer bis zum zentralen bc-Ring auseinander. Das Abdissoziieren einer Untereinheit könnte nun entweder an einem c-Hexamer oder an einem b-Hexamer beginnen. Da Versuche mit nach Harnstoffbehandlung gewonnenen Hexameren zeigen, daß die c-Hexamere

instabiler sind als die b-Hexamere, könnte die Dissoziation bevorzugt an einem c-Hexamer beginnen.

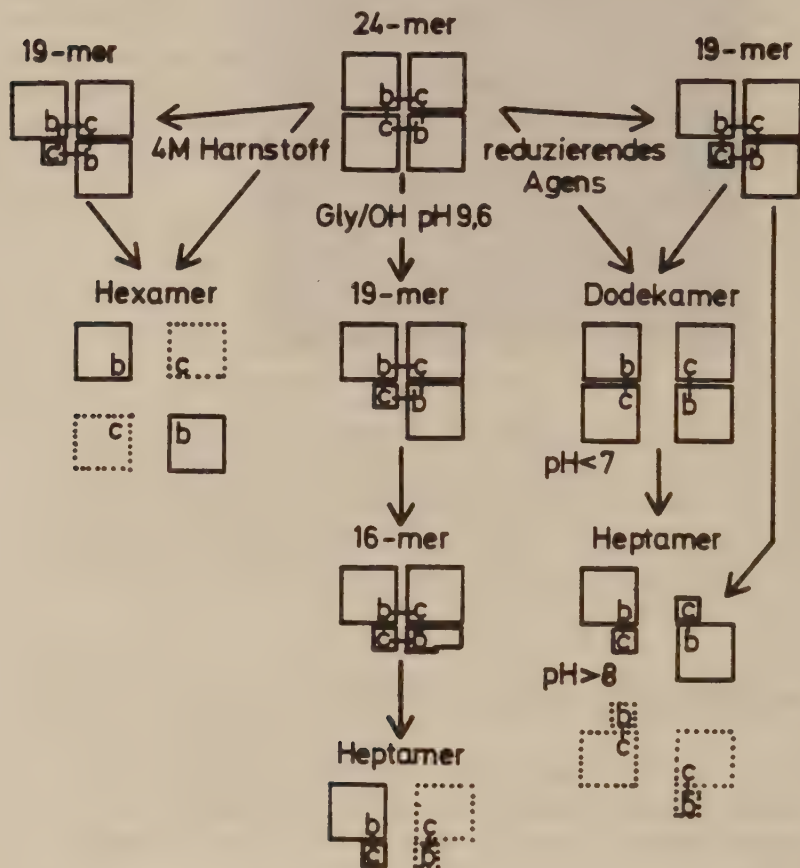


Abbildung 50:
Dissoziationsschema des 37 S-Hämocyansins bei Verwendung verschiedener Reagenzien. Gepunktete Linien bedeutet Instabilität.

In 4M Harnstoff erfolgt dann der Bruch aller Bindungen zwischen den Hexameren; wobei die Bildung von Hexameren

über 19-meren einen Nebenweg darstellen könnte.

Bei der alkalischen Dissoziation werden zuerst Bindungen innerhalb der Hexamere gebrochen (19-mer und 16-mer). Erst wenn mindestens zwei Hexamere "andissoziiert" sind, erfolgt auch die Spaltung zwischen den Dodekameren und damit die Bildung von ein oder zwei Heptameren pro 37 S-Molekül.

Man könnte sich vorstellen, daß bei der 19-meren Zwischenstufe als nächstes die Untereinheiten des diagonal gegenüber stehenden c-Hexamers abdissoziieren. Da jedoch weder in EM-Bildern Strukturen mit zwei über Eck verbundenen Hexameren gefunden werden, noch in der PAGE Aggregate im 24 S-Bereich auftreten, müßte diese Zwischenstufe, wenn sie überhaupt auftritt, sehr instabil sein und sofort weiter zerfallen, eventuell in Heptamere.

Von den beiden möglichen heptameren Aggregaten, b-Heptamer und c-Heptamer, ist wahrscheinlich nur das b-Heptamer stabil. Damit könnte die geringe Ausbeute an Heptameren bei der alkalischen Kurzzeitdissoziation gegenüber der Spaltung mit reduzierenden Reagenzien erklärt werden.

Bei der Spaltung mit reduzierenden Agenzien werden bevorzugt die Bindungen zwischen den beiden Dodekameren gebrochen. Bei $\text{pH} \leq 7$ wird bevorzugt das Dodekamer gebildet, bei $\text{pH} > 8$ dissoziiert es weiter in die heptamere Zwischenstufe. Aus oben genannten Gründen ist wahrscheinlich die Bildung des b-Heptamers häufiger als die des c-Heptamers, welches auch leichter zerfällt.

Neben den Zwischenstufen ist immer ein mehr oder weniger großer Anteil an mono- und dimeren Untereinheiten vorhanden. Wird das Hämocyanin viel länger den verschiedenen Reagenzien ausgesetzt, als bei den einzelnen Versuchen beschrieben, so erfolgt bei alkalischer Dissoziation ein vollständiger Zerfall in Untereinheiten, bei Harnstoffbehandlung und bei Spaltung mit reduzierenden Agenzien Denaturierung.

Die Zwischenstufen Hexamer, Heptamer, Dodekamer und 19-mer treten übrigens auch bei Reassoziationsversuchen eines Untereinheitengemisches auf. Decker (1981) schlug einen Reassoziationsweg über eben diese Zwischenstufen vor.

C) WECHSELWIRKUNGEN ZWISCHEN DEN UNTEREINHEITEN

1. Der Hillkoeffizient- das Problem der Alterung und Schädigung des 37 S-Moleküls

Immer wieder wird die Beobachtung gemacht, daß der Hillkoeffizient, der ein Maß für die Kooperativität darstellt, von Hämocyaninpräparation zu Hämocyaninpräparation schwankt. Diese Schwankungen können erheblich sein; so wurde in seltenen Fällen bei sehr guten Präparationen ein Hillkoeffizient bis $n=10$ ermittelt, während bei der gleichen Präparationsmethode oft nur Werte um $n=5$ vorkommen. In der Regel liegen die Hillkoeffizienten für frisches 37 S-Hämocyanin zwischen 6 und 7. Wird das 37 S-Hämocyanin über Gelfiltration vom Begleitprotein getrennt, so ist damit in den meisten Fällen ein Kooperativitätsverlust verbunden (Groß 1981). Offenbar ist das 37 S-Molekül in Bezug auf die Kooperativität labil, sodaß es während der Aufarbeitung unterschiedlich stark geschädigt werden kann. Schon bei der Punktion des Herzens kann die Präparation mißlingen, wenn geringste Mengen Mitteldarmdrüsenextrakt in die Probe gelangen. Ob der Zustand der Spinne (Häutung, gerade gefressen, gehungert, usw.) einen Einfluß auf die Kooperativität des Hämocyanins hat, ist ungeklärt. Es liegen bisher keinerlei Hinweise auf einen solchen Einfluß vor.

Eine weitere Schädigung kann durch die Gelfiltration eintreten. Wahrscheinlich sind Präparationen, die schon während der Entnahme der Hämolymphe geschädigt wurden, viel anfälliger gegenüber weiterer Behandlung als ungeschädigte Präparationen. Das Gleiche gilt wohl auch für die Alterung des Hämocyanins. Weitere Versuche zur Alterung des Hämocyanins sind bei Groß (1981) beschrieben.

Ein weiterer Faktor, der einen Einfluß auf den Hillkoeffizienten hat, ist die Sauerstoffbindungsmessung selbst. Um das Auftreten eines Sauerstoffkonzentrationsgradienten in der Meßküvette zu vermeiden, muß die Hämocyaninlösung ständig gerührt werden. Dieses Rühren kann jedoch zu einer

mehr oder weniger starken Denaturierung des Hämocyans führen (s. auch S.113). Die Aufnahme einer Sauerstoffbindungskurve sollte daher so schnell wie möglich, d.h. innerhalb von ca. 30 Minuten erfolgen.

Bei allen Hämocyaninpräparationen mit niedriger Kooperativität ist die Affinität zu Sauerstoff im T-Zustand relativ hoch, und, was später noch diskutiert wird, abhängig von der Protonenkonzentration. Decker (1981) führte diese pH-Abhängigkeit des T-Zustandes auf die Anwesenheit von Calcium- und Magnesiumionen im Meßmedium zurück, was meines Erachtens nicht zutrifft.

Das für die Herstellung der Dissoziationszwischenstufen erforderliche Milieu schädigt aller Wahrscheinlichkeit nach auch die äußerlich intakt scheinenden Hämocyaninmoleküle (d.h. nach elektrophoretischer Wanderung, Sedimentationskoeffizienten und Erscheinung im EM), sodaß die Kooperativität der Kontroll-24-mere immer geringer ist, als bei unbehandeltem Hämocyanin. Auch hier ist der Kooperativitätsverlust offenbar von der "Güte" des Ausgangsmaterials abhängig.

Mit 10 mM Calcium + 10 mM Magnesium kann die Kooperativität von geschädigtem Hämocyanin verbessert werden. Das bedeutet, daß diese zweiwertigen Ionen Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten aufrechterhalten, die sonst auf Grund der Schädigung nicht mehr zustande kommen. Vielleicht spielen dabei, wie Perutz (1970) beim Hämoglobin feststellte, Salzbrücken eine Rolle. Wahrscheinlich sind die Calciumionen wichtiger als die Magnesiumionen. Hertl (1979) fand für das Eurypelmahämocyanin bei pH=8,0 ca. 280 Bindungsstellen für Calcium und nur ca. 100 Bindungsstellen für Magnesium.

Während bei zahlreichen Arthropoden zweiwertige Ionen für den Zusammenhalt größerer Oligomere essentiell sind, trifft dies für das Eurypelmahämocyanin nur zum Teil zu (Schmid 1976). Das 37 S-Molekül bleibt bei Dialyse des Hämocyans gegen EDTA-haltigen Puffer bei pH=8,0 stabil. Auch Reassoziation der Untereinheiten zu 37 S-Hämocyanin erfolgt ohne

Zusatz von zweiwertigen Ionen. Allerdings verhindern Calcium- und Magnesiumionen in physiologischen Konzentrationen (4 mM bzw. 1 mM) die Dissoziation in alkalischen Puffern (Loewe und Linzen 1973).

Antonini und Chiancone (1977) betrachten Calciumionen als "cross-linker" zwischen negativ geladenen Gruppen.

Kuiper et al. (1979) und Anderson et al. (1982) postulieren bei Arthropodenhämocyanin zwei Arten von Calcium-Bindungsstellen: eine kleine Zahl sehr affiner Bindungsstellen, die für die Aufrechterhaltung der Quartärstruktur wichtig sind, und zahlreiche wenig affine Bindungsstellen, die bei der Sauerstoffbindung eine Rolle spielen.

Für das 37 S-Hämocyanin von *Eurypelma californicum* sind offenbar die wenig affinen Bindungsstellen für Calcium wichtig, deren Besetzung sich hauptsächlich bei geschädigtem Hämocyanin auf die Kooperativität auswirkt. Dies gilt zumindest bei pH=8,0. Die Kooperativität guter Hämocyaninpräparationen ist unabhängig von zweiwertigen Ionen. Dafür sprechen auch Versuche von Hertl (1979), welcher fand, daß die Bindung von Calcium unabhängig von der Oxygenierung ist.

Forlani et al. (1977) fanden, daß auch die Kooperativität des Hämocyanins von *Helix pomatia* und *Panulirus interruptus* unabhängig von der Calciumionenkonzentration ist. Hingegen stellten Klarman et al. (1975) beim Hämocyanin der Schnecke *Levantina hierosolima* eine deutliche Calciumabhängigkeit der Kooperativität fest, wobei allerdings Übergänge verschiedener Aggregatzustände ineinander eine Rolle spielen.

Zusammenfassend kann man sagen, daß die unterschiedlichen Hillkoeffizienten wohl auf verschieden starke Schädigungen des Hämocyanins bei der Gewinnung und Verarbeitung der Hämolymphe zurückzuführen sind. Für Untersuchungen der Sauerstoffbindungsfunktion sollten nur gute Präparationen verwendet werden, das bedeutet, der maximale Hillkoeffizient sollte nicht schlechter als 7 sein.

2. Die Rolle der einzelnen Untereinheiten

In zwei Versuchsansätzen sollte der Frage nachgegangen werden, ob sich die Spezifität der Untereinheiten bei der Quartärstruktur in einer Spezifität bei der Funktion wieder spiegelt. Die isolierten Untereinheiten verhalten sich bei der Sauerstoffbindung gleichartig.

Die Ergebnisse eines Versuchsprogramms, bei dem F(ab)-Fragmente an die einzelnen Untereinheiten im nativen 37 S-Molekül gebunden wurden, wiesen den Untereinheiten e und eventuell b eine besondere Rolle bei der Sauerstoffbindung zu. Während die Kooperativität bei Besetzung der anderen Untereinheiten mit F(ab)-Fragmenten zwar gegenüber einem Vergleichs- 37 S-Hämocyanin herabgesetzt ist (jedoch für alle gleichartig), ist sie bei Besetzung der Untereinheit e stark erniedrigt. Auch bei F(ab)-Komplexen an Untereinheit b ist eine etwas stärkere Kooperativitätserniedrigung festzustellen. Die Affinität zu Sauerstoff bei Halbsättigung ist bei F(ab)-e-Komplexen und bei F(ab)-b-Komplexen gegenüber den anderen Komplexen erhöht.

Die Bedeutung der Untereinheit e scheint durch das Ergebnis eines anderen Versuches, bei dem in einem Dissoziations-Reassoziations-Experiment Untereinheit e durch apo-e ersetzt wurde, bestätigt zu werden. Die Kooperativität dieses apo-e-37 S-Hämocyanins war niedriger als die Kooperativität eines Kontroll- 37 S-Hämocyanins. Der p_{50} -Wert war gleich.

Van Driel (1973) stellte von *Helix pomatia*-Hämocyanin Hybride mit apo Untereinheiten her, indem er Dissoziate aus nativem Hämocyanin mit Dissoziaten aus apo-Hämocyanin mischte und wieder reassozierte. Er stellte fest, daß mit wachsendem Anteil an apo-Hämocyanin die Kooperativität absank und die Affinität zu Sauerstoff anstieg.

Decker (1981) schrieb der Untereinheit e ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Sauerstoffbindung zu. Er stellte bei Reassoziationsexperimenten fest, daß ohne Untereinheit e zwar 37 S-Moleküle aufgebaut werden können (e wird

wahrscheinlich durch d ersetzt, die Moleküle sind relativ instabil), diese aber den Sauerstoff nicht mehr kooperativ binden.

Auch das Dimer bc ist nach Versuchen von Decker wichtig, da Hexamere, die aus verschiedenen Untereinheiten rekonstituiert waren, nur dann kooperativ waren, wenn das Dimer bc eingebaut war. Dieser Befund würde sich mit den Ergebnissen der F(ab)-Versuche decken. Das Dimer bc käme damit als Überträger allosterischer Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten, eventuell zwischen Hexameren, in Frage. Untereinheit e könnte nach Decker (1981) für die Aufrechterhaltung eines gewissen Spannungszustandes im Molekül verantwortlich sein.

Die Aussagekraft der F(ab)-Versuche muß sehr kritisch betrachtet werden. So ist die Wahrscheinlichkeit, daß eine Untereinheit im nativen 37 S-Molekül mit F(ab)-Fragmenten besetzt wird, bedingt durch den charakteristischen Aufbau des Moleküls, für jede Untereinheit unterschiedlich groß. Eine Kontrolle über den Besetzungsgrad ist aus auf S. 93 diskutierten Gründen nur bedingt möglich. Daher können eigentlich nur Untereinheiten miteinander verglichen werden, bei denen die Wahrscheinlichkeit einer Besetzung etwa gleich ist; z.B. die Untereinheiten e und g, oder e und e+g zusammen, sowie die Untereinheiten b und c. Eine weitere Schwierigkeit der Interpretation besteht in der Möglichkeit, daß antigene Determinanten nicht unbedingt auch einen Einfluß auf die Wechselwirkungen mit anderen Untereinheiten haben, so daß die Besetzung mit F(ab)-Fragmenten bei manchen Untereinheiten vielleicht unbemerkt bleibt.

Krüger und Hess (1968) stellten fest, daß die Gesamtaktivität von Pyruvatkinase von *Saccharomyces carlsbergensis* durch die Bindung von Antikörpern herabgesetzt wird. Dies wurde auch bei anderen Enzymen gefunden (z.B. Michaelides et al., 1964, bei der Muskelphosphorylase). Die Aktivierung der Pyruvatkinase durch 1,6 Fructose-di-phosphat wird jedoch weder direkt (sterisch) noch indirekt (allosterisch) durch die Besetzung mit Antikörpern beeinflusst (Krüger und Hess, 1968)

Trotz allem sind die Ergebnisse der F(ab)-Versuche in Verbindung mit anderen Versuchsreihen, z.B. den Reassoziationsversuchen mit apo-Untereinheiten von Bedeutung.

Die Schwierigkeit bei diesen letzteren Versuchen liegt darin, daß nur nach schneller Dissoziation und sofortiger Reassoziations 37 S-Moleküle mit hoher Kooperativität rekonstituiert werden können. Da jedoch für die Ausfällung einer Untereinheit und den Ersatz durch die apo-Untereinheit (bei der Kontrolle durch die gleiche Untereinheit) eine Reihe von Manipulationen nötig ist, ist die Kooperativität der reassozierten Moleküle a priori mehr oder weniger stark erniedrigt. Außerdem ist die Ausbeute an reassoziertem 37 S-Hämocyanin meist sehr gering. Zur Zeit werden einerseits Experimente durchgeführt, bei denen versucht wird, das 37 S-Hämocyanin schonend in neutralen Phosphatpuffern zu dissoziieren (nach Schmid 1976); andererseits solche, bei denen durch Affinitätschromatographie jeweils eine Untereinheit schnell aus dem Dissoziat entfernt wird. Wenn diese Versuche erfolgreich sind, bieten sich eine ganze Reihe von Experimenten mit diesen "alle ohne eine"-Gemischen an, sei es Reassoziations mit apo-Untereinheiten, mit Untereinheiten bei denen Cu^{I} zu Cu^{II} oxidiert wurde (Methämocyanin), oder seien es Versuche, Hybride mit Hämocyaninuntereinheiten anderer, verwandter Cheliceraten herzustellen und funktionell zu untersuchen. Besonders reizvoll wäre die Untersuchung von Hybriden mit Untereinheiten des Limulushämocyanins, da das Limulushämocyanin einen umgekehrten Bohreffekt besitzt (Redfield, 1930).

3. Kooperativität bei Dissoziationszwischenstufen

Die Ergebnisse der Sauerstoffbindungsstudien an Dissoziationszwischenstufen zeigen deutlich, daß alle 24 Untereinheiten vorhanden sein müssen, um die Kooperativität des 37 S-Hämocyanins zu erreichen. Gegen den Verdacht, daß die Erniedrigung der Kooperativität in den Zwischen-

stufen lediglich auf eine steigende Schädigung der Moleküle durch die Spaltreagenzien zurückzuführen ist, sprechen folgende Argumente: a) die meisten Zwischenstufen (19-mer, Dodekamer, Heptamer) wurden auf verschiedenen Wegen mit ganz unterschiedlichen Reagenzien hergestellt, die Ergebnisse sind jedoch stets gleich. b) Es wurde immer zur Kontrolle ein gleichartig behandeltes 37 S-Hämocyanin mituntersucht, dessen Kooperativität stets viel höher war als die der Zwischenstufen. c) Die 19-mere Zwischenstufe wurde zum Teil aus PA-Gelen sowohl ohne vorhergehende Behandlung des 37 S-Hämocyanins als auch nach der sehr schonenden Behandlung mit Saccharose isoliert. Der Kooperativitätsabfall gegenüber dem jeweiligen Kontrollhämocyanin war jedoch genau so groß wie nach Behandlung mit Spaltreagenzien.

Ein entscheidender Beweis gegen eine Schädigung als einzige Ursache des Kooperativitätsverlustes der Zwischenstufen sind die Versuche, bei denen Hexamere dissoziiert und wieder reassoziert wurden, und in denen die zum Teil entstandenen und isolierten 24-mere wieder die für das Kontroll-37 S-Hämocyanin typische, relativ hohe Kooperativität zeigten.

Die Ursache des Kooperativitätsverlustes bei den Dissoziationszwischenstufen ist also eindeutig auf die geringere Ausdehnung der Aggregate, d.h. auf die geringere Zahl der in Wechselwirkung stehenden Untereinheiten zurückzuführen.

Eine gewisse Problematik liegt im Vergleich verschiedener Zwischenstufenpräparationen, auch wenn mit den gleichen Spaltreagenzien gearbeitet wurde. Schon bei dem 37 S-Kontroll-Hämocyanin ist die Kooperativität von Versuch zu Versuch verschieden. Dies kann von der "Güte" des Ausgangsmaterials, von der Dauer der Einwirkung der Reagenzien oder anderen unbekannten Faktoren abhängen. Schwierigkeiten entstehen bei der Bildung von Mittelwerten für die Hillkoeffizienten aus verschiedenen Präparationen. Die Abweichungen von den Mittelwerten würden sehr groß, was in Bezug auf das Gesamtergebnis ein falsches Bild vortäuschen

würde, denn der prozentuale Abfall der Kooperativität (davon wurden Mittelwerte gebildet) von Zwischenstufe zu Zwischenstufe ist in jeder Präparation fast gleich. Außerdem würden besondere Ergebnisse überdeckt werden, z.B. daß bei guten Präparationen (Kooperativität des 37 S-Kontroll-Hämocyanins relativ hoch) eine Abhängigkeit des n_{50} und des n_{max} vom pH-Wert bis auf die Stufe des Dodekamers hinab festzustellen ist, bei schlechten Präparationen der pH-Wert jedoch keinen Einfluß auf den Hillkoeffizienten des Dodekamers hat. Das bedeutet, schädigende Einflüsse wirken sich genau so wie auf das 24-mer auch auf die Zwischenstufen aus.

Auf Grund der Abhängigkeit der Kooperativität von verschiedenen Präparationen, wobei sich jedoch die prozentualen Unterschiede zwischen den Zwischenstufen nicht ändern, kann man hypothetische Kooperativitäten für "Zwischenstufenreihen" angeben, deren Kontroll-37 S-Hämocyanin einen Hillkoeffizienten von ca. 8 hätte. Das 19-mer hätte dann einen n_{50} von ca. 4,5, das Heptamer und das Hexamer von ca. 2,5. Dafür sprächen auch die Versuche unter Zusatz von 10 mM Calcium + 10 mM Magnesium; auch hier konnte die Kooperativität aller Zwischenstufen prozentual gleichartig verbessert werden.

Im Gegensatz zur Ausbildung der Kooperativität, also homotroper Wechselwirkungen, sind für den Bohr-Effekt, also für heterotrope Wechselwirkungen nur sechs Untereinheiten nötig. Die kleinste erhaltene Zwischenstufe, das Hexamer, besitzt bei Halbsättigung die gleiche Affinität zu Sauerstoff wie das 37 S-Molekül, und der Bohr-Effekt ist vollständig erhalten. Für die heterotropen Wechselwirkungen, den Einfluß der Protonen auf die Sauerstoffaffinität, stellt daher das Hexamer die allosterische Einheit dar.

Deutliche Unterschiede zwischen 24-meren und Hexameren treten bei der Betrachtung der Affinität zu Sauerstoff im T-Zustand auf. Während der K_T beim 24-mer unabhängig vom pH-Wert ist (Loewe 1978), ist bei Hexameren eine dem Bohr-Effekt vergleichbare Abhängigkeit vorhanden. Bei geschä-

digtem 37 S-Hämocyanin ist ebenfalls eine Affinitätserhöhung des T-Zustandes, sowie eine gewisse pH-Abhängigkeit, festzustellen.

Die Abhängigkeit des T-Zustandes von verschiedenen Parametern wird in der Literatur öfters beschrieben. Bei *Helix pomatia* ist die Gleichgewichtskonstante K_T abhängig vom pH-Wert (Zolla et al., 1978), bei *Limulus* und *Penaeus* besteht eine Abhängigkeit von der Chloridkonzentration (Brouwer 1977 und 1978); bei Hämoglobin stellte Imai (1973) eine Abhängigkeit von 2,3-DPG fest.

Die Sauerstoffaffinität des T-Zustandes ist mit der Größe der Dissoziationszwischenstufen umgekehrt korreliert. Je kleiner die Aggregationsstufe ist, um so größer wird die Affinität; je mehr Untereinheiten zusammenwirken, um so leichter kann ein gespannter, energiereicher Zustand im Molekül aufgebaut werden.

Der stufenförmige Abfall der Kooperativität vom 24-mer zum 19-mer und vom Dodekamer zum Heptamer (Abb. 51) läßt folgende Spekulation zu:

Offenbar sind die Wechselwirkungen zwischen den Hexameren innerhalb eines Dodekamers für das kooperative Verhalten des Gesamtmoleküls von entscheidender Bedeutung. Sobald ein Hexamer innerhalb eines Dodekamers fehlt, kann auch das andere Hexamer nichts mehr zur Erhöhung der Gesamtkooperativität beitragen. Das zeigt sich darin, daß Dodekamere fast die gleiche Kooperativität aufweisen wie 19-mere ($n_{24\text{-mer}} > n_{19\text{-mer}} = n_{12\text{-mer}}$). Damit käme den Untereinheiten bc, a und d als Verbindung zwischen den Hexameren eine besondere Bedeutung zu. Daß Untereinheit b bzw. bc bei der Sauerstoffbindung wichtig ist, wurde bereits erwähnt; für Untereinheit a und d liegen keine entsprechenden Daten vor. Es sollte erwähnt werden, daß Untereinheit a in *Androctonus*-Hämocyanin durch zwei verschiedene Untereinheiten repräsentiert wird, die Untereinheiten 3A und 3B (Lamy et al., 1981).

Die Wechselwirkungen zwischen zwei Dodekamern sind vielleicht schwächer, aber für die hohe Kooperativität des

37 S-Moleküls unbedingt notwendig. Immerhin bringt der Schritt Dodekamer - 24-mer eine 100%ige Kooperativitäts-erhöhung.

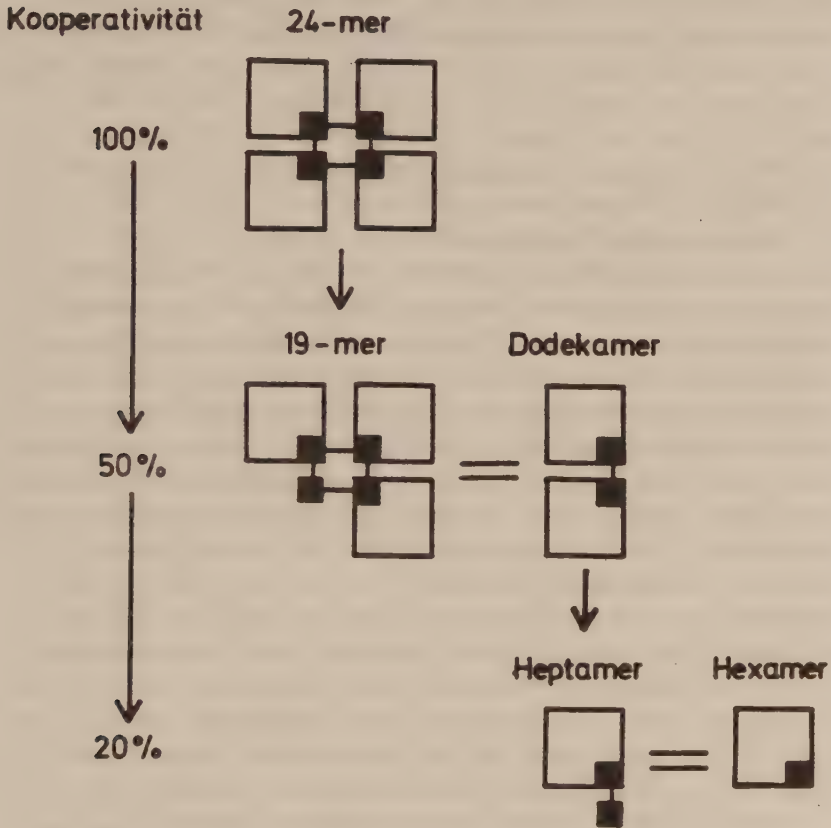


Abbildung 51:
Prozentualer Abfall der Kooperativität in den Zwischenstufen.

Die Hypothese zur Wechselwirkung zwischen Hexameren und Dodekameren würde zu Überlegungen von Colosimo et al. (1974) passen, die eine Hierarchie der Wechselwirkungen diskutie-

ren: danach gibt es eine bestimmte Anzahl kleiner Konstellationen mit stark interagierenden Untereinheiten; im Falle des Eurypelmahämocyanins wären dies Dodekamere. Darüber hinaus müssen Interaktionen zwischen den Konstellationen stattfinden, in unserem Beispiel also zwischen zwei Dodekameren. Die Integrität des ganzen Moleküls ist also Bedingung für die hohe Kooperativität. Zu ähnlichen Ergebnissen kam van Driel(1973). Er stellte fest, daß bei dem Hämocyanin aus *Helix pomatia* Wechselwirkungen zwischen 1/10 Molekülen für die Kooperativität verantwortlich sind. 1/10 Moleküle allein sind nicht kooperativ, obwohl sie aus acht sauerstoffbindenden Domänen bestehen.

Für das Eurypelmahämocyanin kämen als kleine Konstellationen zwar die Hexamere in Betracht, dagegen spricht jedoch die Bedeutung der starken Wechselwirkungen, die gerade zwischen zwei Hexameren gefordert werden. Besser vorstellbar wären drei Hierarchiestufen der Wechselwirkungen: schwache Wechselwirkungen innerhalb eines Hexamers, starke Wechselwirkungen zwischen zwei Hexameren und wieder schwächere (aber essentielle) Wechselwirkungen zwischen zwei Dodekameren. Dies wäre mit dem Muster des beobachteten Kooperativitätsabfalls vereinbar.

Brenowitz et al.(1984) kamen bei der funktionellen Untersuchung von Dissoziationszwischenstufen des Pfeilschwanzes *Limulus polyphemus* zu folgenden Ergebnissen: sie fanden, daß sich das 48-mer funktionell nicht vom 24-mer unterscheidet. Die Kooperativität des 48-mers war jedoch sehr gering, $n_{50}=1,9$. Zwischen 24-mer und 12-mer fanden sie Unterschiede sowohl in der Kooperativität als auch im Bohr-Effekt (beide sind beim 12-mer niedriger). Allerdings waren die Bedingungen, unter denen die Sauerstoffbindungsdaten der verschiedenen Aggregate gemessen wurden, nicht gleich. Das 48-mer ist nur bei Anwesenheit von zweiwertigen Kationen stabil, das 24-mer nur bei Abwesenheit zweiwertiger Kationen, und das 12-mer nur unterhalb $pH=5$. Hier liegt eine Parallele zum Eurypelmahämocyanin vor, bei dem das 12-mer auch nur unterhalb $pH=5$ stabil ist,

d.h. nicht zum 24-mer reassoziert. Durch Carboxymethylierung konnte jedoch eine Stabilisierung auch bei neutralen und leicht alkalischen pH-Werten erreicht werden.

Der entscheidende Vorteil meiner Versuche liegt darin, daß die Sauerstoffbindungsdaten der Zwischenstufen und eines Kontroll-24-mers immer unter den gleichen Bedingungen gewonnen wurden und somit direkt vergleichbar sind.

4. Van Holde-Diagramm und allosterische Einheit

Eine völlig andere Methode, Aussagen zur allosterischen Einheit zu machen, als der Weg über die Dissoziationszwischenstufen, ist die Auswertung von Sauerstoffbindungskurven des 37 S-Hämocyanins mit Hilfe des van Holde-Diagramms. (Decker et al., 1983). Aus der Steigung der Kurven in diesem Diagramm läßt sich die Zahl N der miteinander in Wechselwirkung stehenden Untereinheiten bestimmen. Nach Ergebnissen von Decker (1981) und nach eigenen Ergebnissen ist bei nativem 37 S-Hämocyanin die Zahl $N=8-9$. Dies scheint ein Widerspruch zu den Versuchen mit Dissoziationszwischenstufen zu sein, nach denen ja alle 24 Untereinheiten für die Ausbildung der Kooperativität nötig sind. Eine Erklärung wäre vielleicht folgende: das van Holde-Diagramm folgt aus der Gleichung des MWC-Modells. Für Moleküle, die den Gesetzen der MWC-Theorie folgen, werden in diesem Diagramm Geraden gefordert, aus deren Steigung N bestimmt wird. Die Transformation der Sauerstoffbindungskurven des 37 S-Hämocyanins ergibt jedoch keine Geraden über den ganzen Sättigungsbereich, sondern längere Geradenanteile treten erst nach Halbsättigung auf. Das könnte bedeuten, daß erst nach Halbsättigung die Sauerstoffbeladung des Moleküls der MWC-Theorie folgt. Die Zahl der in Wechselwirkung tretenden Untereinheiten $N=8-9$ besitzt demnach nur für die Beladung der zweiten Hälfte des Moleküls Gültigkeit. Dies würde das Auftreten von Hybridzuständen voraussetzen (s.u.).

Die Sauerstoffbindungskurven der kleinsten Dissoziations-

zwischenstufen Hexamer und Heptamer ergeben dagegen im van Holde-Diagramm Geraden. Das bedeutet, die Sauerstoffbeladung erfolgt nach dem MWC-Modell.

Andererseits schlossen Brouwer et al. (1978a) für das hexamere Hämocyanin der Garnele *Penaeus* durch "curve fitting" mittels eines nach Buc et al. (1973) erweiterten MWC-Modells, daß Hybridzustände (R_3T_3) auftreten.

Brouwer et al. (1977) bestimmten für *Limulushämocyanin* (48 Untereinheiten) durch "curve fitting" mittels eines nach Rubin und Changeux (1966) sowie Blangly et al. (1968) erweiterten MWC-Modells die Zahl der in Wechselwirkung tretenden Untereinheiten mit $N=6$. Sie schlossen daraus, daß ein Hexamer die allosterische Einheit darstellt, und daß keine Wechselwirkungen zwischen den Hexameren stattfinden. Das würde wiederum bedeuten, daß Hybridzustände auftreten (T-Hexamere und R-Hexamere). Im Zusammenhang mit diesen Ergebnissen muß die sehr viel geringere Kooperativität des nativen *Limulushämocyanins* ($n_{\max}$ maximal 3), verglichen mit dem *Eurypelmahämocyanin*, gesehen werden.

Für das 24-mere Hämocyanin des Maulwurfkrebses *Callinassa californiensis* bestimmten Arisaka und Van Holde (1979) ebenfalls das Hexamer als allosterische Einheit ("curve fitting" mittels eines Hybridmodells nach Buc et al., 1973). Auch bei diesem Hämocyanin liegt der maximale Hillkoeffizient bei ca. 3. Es sei daran erinnert, daß der auf "intaktes" Hämocyanin hin extrapolierte Hillkoeffizient eines Hexamers in einer Dissoziationszwischenstufenreihe (s.S. 136) bei ca. 2,5 liegen würde.

Zwischen den Begriffen allosterische Einheit und Anzahl der miteinander in Wechselwirkung tretenden Untereinheiten muß meines Erachtens unterschieden werden. Die Anzahl der in Wechselwirkung stehenden Untereinheiten könnte sich bei der Beladung mit Sauerstoff kontinuierlich oder sprunghaft ändern; die allosterische Einheit ist eine Konstante, nämlich die Anzahl der in Wechselwirkung stehenden Untereinheiten, die für die Ausbildung einer bestimmten Kooperativität nötig ist. Für das native 37 S-Hämocyanin von

Eurypelma bestünde demnach die allosterische Einheit aus 24 Untereinheiten; die Anzahl der in Wechselwirkung stehenden Untereinheiten kann mit Hilfe des van Holde-Diagramms nur nach Halbsättigung bestimmt werden und beträgt $N=8-9$. Dabei ist nicht ausgesagt, daß immer die gleichen Untereinheiten in Wechselwirkung stehen.

Schließlich sei noch eine Bemerkung zu den "Knicks" im van Holde-Diagramm erlaubt. Ob die Teilgeraden über die Beladung des Hämocyanins mit Sauerstoff etwas aussagen, wie Decker (1981) vermutete, oder ob es sich um Meß- bzw. Transformationsartefakte handelt, muß in einer größeren Versuchsreihe festgestellt werden. Viele Sauerstoffbindungskurven des 37 S-Hämocyanins müßten unter identischen Bedingungen gemessen und miteinander verglichen werden.

5. Vorstellungen über die Beladung der einzelnen Untereinheiten mit Sauerstoff und die daraus folgenden allosterischen Wechselwirkungen

Voraussetzung für die folgenden Hypothesen (Abb.52) ist eine dreistufige Hierarchie der Interaktionen. Auf der ersten Stufe finden schwächere Wechselwirkungen innerhalb von Hexameren statt. Diese Wechselwirkungen sind verantwortlich für eine gewisse "Grundkooperativität", die auch stark geschädigte 37 S-Moleküle noch besitzen. Auf der zweiten Stufe finden sehr starke Wechselwirkungen zwischen zwei eng benachbarten Hexameren statt. Diese sind verantwortlich für die hohe Kooperativität. Sie stehen in engem Zusammenhang mit Wechselwirkungen der dritten Stufe, welche wahrscheinlich schwächer, aber unbedingt notwendig sind und zwischen zwei Dodekameren stattfinden. Die Anwesenheit zweier vollständiger Dodekamere ist Voraussetzung für die starken Interaktionen zwischen den Hexameren.

Nachdem eine Untereinheit mit Sauerstoff besetzt worden ist, wechselt eine Dodekamereinheit vom T-Zustand in den R-Zustand über. Eine weitere Sauerstoffbesetzung dieses

Dodekamers erfolgt sehr schnell. Wenn die erste Untereinheit des zweiten Dodekamers mit Sauerstoff besetzt wird, (noch vor Halbsättigung ist die Wahrscheinlichkeit, daß das zweite Dodekamer trotz T-Zustand besetzt wird, größer als eine weitere Besetzung des ersten Dodekamers) wechselt auch dieses in den R-Zustand über, und es erfolgt eine weitere schnelle Besetzung des Moleküls mit Sauerstoff. Bei der zweiten Hälfte der Oxygenierung geht das Molekül vollständig von einem Zustand, in diesem Fall einem Hybridzustand T_{12}/R_{12} , in einen anderen Zustand über, den R_{24} -Zustand. Das bedeutet, nach Halbsättigung gelten die Gesetze der MWC-Theorie, was mit dem Geradenanteil im van Holde-Diagramm übereinstimmt. Das Modell setzt also im Zuge der Sauerstoffbeladung einen T_{12}/R_{12} -Hybridzustand voraus. Allerdings kann auch das Auftreten von Hybridzuständen zwischen Hexameren (T_{18}/R_6 oder T_6/R_{18}) oder sogar zwischen einzelnen Untereinheiten (T_i/R_j ; $i=1-x$, $j=1-24-x$) nicht ausgeschlossen werden.

Für die Funktion der Pyruvatkinase von *Saccharomyces carlsbergensis*, die aus vier Protomeren besteht, diskutieren Johannes und Hess (1972) ebenfalls einen Hybridzustand. Nach Berechnungen von Arisaka und Van Holde (1979) erfolgt die Sauerstoffbeladung des Hämocyanins von *Callinassa* auch über einen Hybridzustand. Eine weitere Analogie wäre die Sauerstoffbesetzung des Hämoglobins nach Perutz (1970). Dabei werden zuerst die beiden α -Ketten oxygeniert, dann erfolgt das Umklappen des Moleküls in den R-Zustand, und dann werden die beiden β -Ketten beladen. Perutz läßt allerdings auch die Möglichkeit offen, daß die Transformation in den R-Zustand erst nach der Beladung der dritten Kette erfolgt.

Abb. 52 zeigt weiterhin Hypothesen für die Oxygenierung der Dissoziationszwischenstufen. Beim 19-mer würde danach zuerst das einzelne Hexamer beladen, das durch den Verlust des zweiten Hexamers wahrscheinlich in einem sauerstoffaffineren Zustand ist; die Beladung des zweiten Dodekamers kann unmittelbar oder über einen Hybridzustand erfolgen.

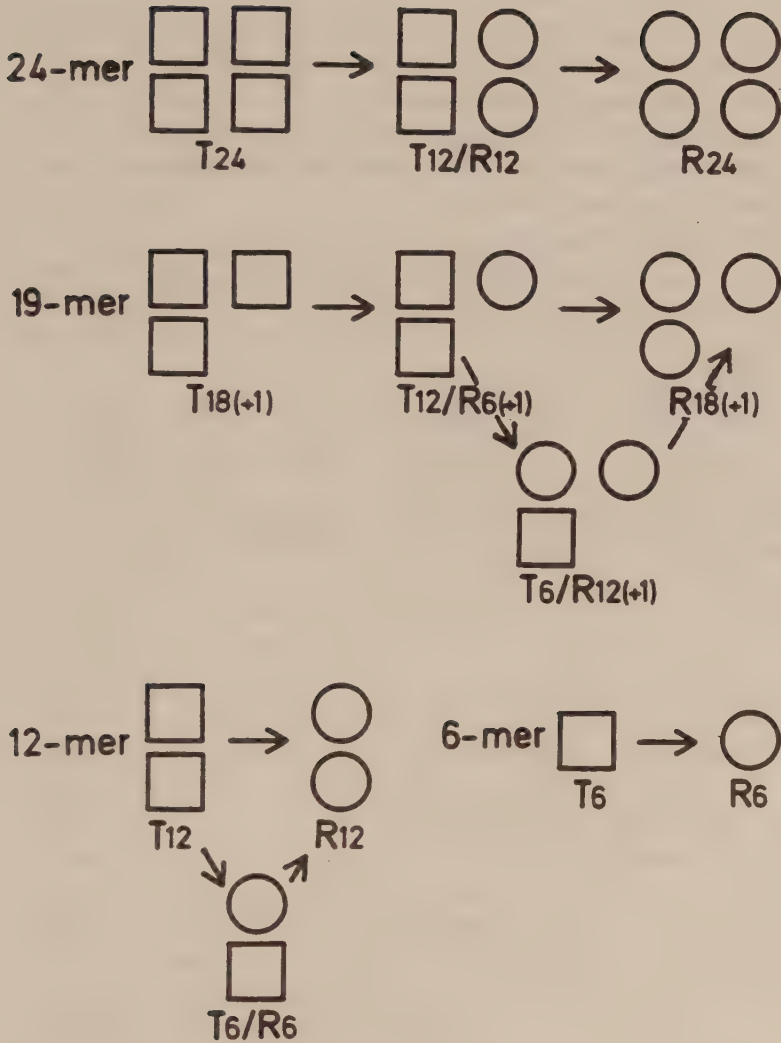


Abbildung 52:

Hypothese für die Oxygenierung des 37 S-Hämocyansins von *Eurypelma californicum* und der Dissoziationsstufen. Ein Quadrat bedeutet ein Hexamer im T-Zustand, ein Kreis bedeutet ein Hexamer im R-Zustand.

Auch das Dodekamer kann vollständig oder über ein Hybrid in den R-Zustand umklappen. Die verlängerten Geradenanteile im van Holde-Diagramm für 19-mer und Dodekamer würden für diese Hypothese sprechen.

Heptamere und Hexamere gehen offenbar unmittelbar, ohne Hybridbildung, vom T- in den R-Zustand über (Geraden im van Holde-Diagramm).

Die funktionellen Ergebnisse dieser Arbeit lassen den Schluß zu, daß für die Ausbildung der hohen Kooperativität des 37 S-Hämocyanins im Wesentlichen drei Faktoren verantwortlich sind:

- a) die große Anzahl der Untereinheiten (24)
- b) die Integrität der Wechselwirkungen zwischen bestimmten Untereinheiten oder Untereinheitenverbänden (Hexamere, Dodekamere)
- c) die Aufrechterhaltung eines Spannungszustandes im T-Zustand des Moleküls

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Untersuchung von Dissoziationszwischenstufen auf ihre Zusammensetzung aus Untereinheiten lieferte einen Beitrag zur Aufklärung der Quartärstruktur des 37 S-Hämocyanins. Die Dissoziationszwischenstufen entstehen nach partieller Dissoziation des 37 S-Hämocyanins (19-mer, 16-mer und Heptamer), nach Spaltung mit β -Mercapto- α -thanol (12-mer und Heptamer), sowie nach Spaltung mit 4 M Harnstoff (Hexamer). Sie wurden aus PA-Gelen isoliert, in Untereinheiten dissoziiert, einer zweidimensionalen Immunelektrophorese unterworfen, und die Zusammensetzung aus Untereinheiten anhand planimetrischer Auswertung der Flächen unter den einzelnen Untereinheitengipfeln errechnet. Als Referenz diente gleichermaßen behandeltes 37 S-Hämocyanin, dessen Zusammensetzung aus Untereinheiten nach Klärung des Verhältnisses Untereinheit a zu Untereinheit g bekannt war: 4a, 2b, 2c, 4d, 4e, 4f und 4g. Das 19-mer setzt sich demnach aus den Untereinheiten 3a, 2b, 2c, 3d, 3e, 3f und 3g zusammen, das 16-mer aus 3a, 2b, 2c, 3d, 2e, 2f und 2g, das Dodekamer aus 2a, 1b, 1c, 2d, 2e, 2f und 2g, das Heptamer aus 1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 1f und 1g und das Hexamer aus 1a, 1b oder 1c, 1d, 1e, 1f und 1g. Auf Grund dieser Zusammensetzung der Zwischenstufen aus Untereinheiten und auf Grund des Auftretens bestimmter Zwischenstufen sowie auf Grund der morphologischen Struktur des 37 S-Moleküls wurde einerseits ein Modell für die Quartärstruktur des 37 S-Moleküls, andererseits ein möglicher Dissoziationsweg vorgeschlagen.

2. Die Kenntnis des Aufbaus der Dissoziationszwischenstufen war Voraussetzung für ein Programm, bei dem versucht werden sollte, etwas über Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten bei der Sauerstoffbindung auszusagen. Dazu wurden die Dissoziationszwischenstufen 19-mer, Dodekamer, Heptamer und Hexamer auf ihre Funktion

bei der Sauerstoffbindung untersucht. Zuerst mußten Methoden gefunden werden, mit denen die Zwischenstufen schonend hergestellt werden konnten. Das 19-mer, das Heptamer und das Hexamer waren nach ihrer Isolierung stabil, das Dodekamer reassozierte jedoch zum 24-mer und mußte daher durch Carboxymethylierung stabilisiert werden.

Für die Ausbildung der hohen Kooperativität des 37 S-Moleküls sind alle 24 Untereinheiten nötig. Schon das 19-mer besitzt eine wesentlich geringere Kooperativität, die der Kooperativität des Dodekamers entspricht. Vom Dodekamer zum Heptamer besteht wiederum ein Kooperativitätsabfall. Die Kooperativität des Hexamers entspricht etwa der Kooperativität des Heptamers. Die Affinität zu Sauerstoff bei Halbsättigung ist bei allen Dissoziationszwischenstufen und beim Kontroll-37 S-Hämocyanin gleich, auch der Bohreffekt ist auf jeder Aggregationsstufe gleichermaßen ausgebildet. Er ist bereits bei der kleinsten Zwischenstufe, dem Hexamer, genauso vorhanden, wie beim 24-mer.

Aus dem treppenartigen Abfall der Kooperativität der Zwischenstufen wurde geschlossen, daß offenbar Wechselwirkungen zwischen den Hexameren innerhalb eines Dodekamers für das kooperative Verhalten des Gesamt-moleküls von entscheidender Bedeutung sind. Wechselwirkungen zwischen zwei Dodekameran sind wahrscheinlich schwächer, aber unbedingt notwendig, da der Schritt Dodekamer-24-mer eine 100%ige Kooperativitätserhöhung bringt. Wechselwirkungen innerhalb eines Hexamers sind wahrscheinlich für eine gewisse "Grundkooperativität" verantwortlich.

3. Die Rolle der einzelnen Untereinheiten bei der Sauerstoffbindung sollte mit Hilfe zweier Versuchsprogramme untersucht werden. Erstens wurden untereinheitenspezifische F(ab)-Fragmente an das native 37 S-Hämocyanin gebunden. Dabei zeigten F(ab)-Komplexe mit F(ab)-Frag-

menten gegen Untereinheit e und gegen Untereinheit b eine geringere Kooperativität und eine größere Affinität zu Sauerstoff als die anderen Komplexe und das Kontroll-37 S-Hämocyanin.

Zweitens wurden in Dissoziations-Reassoziations-Experimenten apo-Untereinheiten in 37 S-Moleküle eingebaut. Vorversuche zeigten, daß sowohl eine schonende Entfernung des Kupfers aus den Untereinheiten, als auch ein Einbau der apo-Untereinheit in das 37 S-Molekül möglich war. Der Versuch wurde nur mit Untereinheit apo-e reproduzierbar durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß das apo-e-Reassoziat sehr viel weniger kooperativ ist, als das Kontroll-Reassoziat, daß die Affinität zu Sauerstoff jedoch gleich ist. Daraus wurde auf eine gewisse Bedeutung der Untereinheit e und eventuell der Untereinheit b (F(ab)-Versuche) für die Kooperativität des 37 S-Hämocyanins geschlossen.

4. Die Sauerstoffbindungseigenschaften von nativem 37 S-Hämocyanin wurden im Bereich und unterhalb des IEP's sowie unter Einfluß von 10 mM Calcium und 10 mM Magnesium bei pH 8,0 untersucht.

Zwischen pH 5 und pH 4 liegt ein umgekehrter Bohreffekt vor ($\Delta \log p_{50} / \Delta \text{pH} = 1,1$), der zahlenmäßig dem normalen Bohreffekt zwischen pH 8,0 und pH 8,5 entspricht. Die Kooperativität fällt zwischen pH 7 und pH 4 von $n_{50}=2,7$ auf $n_{50}=1,0$ ab.

Calcium- und Magnesiumionen haben offenbar eine stabilisierende Wirkung auf das 37 S-Hämocyanin, was vor allem bei gealtertem und geschädigtem Hämocyanin durch eine Erhöhung der Kooperativität sichtbar wird.

5. Mit Hilfe eines von Van Holde vorgeschlagenen Diagramms, das aus der MWC-Gleichung abgeleitet ist, wurden Sauerstoffbindungskurven des nativen 37 S-Hämocyanins sowie der Dissoziationszwischenstufen ausgewertet. Aus der Steigung der Kurven in diesem Diagramm kann die Anzahl

der in Wechselwirkung stehenden Untereinheiten abgelesen werden; es ergeben sich Geraden, wenn die Voraussetzungen der MWC-Theorie erfüllt sind. Dies trifft jedoch nur für das Hexamer zu, alle anderen Zwischenstufen und natives 37 S-Hämocyanin ergeben über den ganzen Sättigungsbereich keine Geraden, sondern nur gerade Abschnitte, die mit kleiner werdenden Zwischenstufen länger werden. Die Zahl der in Wechselwirkung stehenden Untereinheiten beträgt bei Halbsättigung ca. 8 für natives Hämocyanin; für die Zwischenstufen und das Kontroll-37 S-Hämocyanin liegt sie bei ca. 4-5. Da jedoch die allosterische Einheit, also die Anzahl der Untereinheiten, die für die hohe Kooperativität des 37 S-Hämocyanins nötig sind, bei 24 Untereinheiten liegt, muß die Anzahl der in Wechselwirkung stehenden Untereinheiten meines Erachtens getrennt von der allosterischen Einheit gesehen werden.

6. Auf Grund der funktionellen Ergebnisse wurde eine Hypothese für die Beladung der einzelnen Untereinheiten mit Sauerstoff und die daraus folgenden Wechselwirkungen aufgestellt.

L I T E R A T U R

- Adair G.S. (1925): The hemoglobin system VI. The oxygen dissociation curve of hemoglobin.
J.Biol.Chem. 63 , 529-545.
- Anderson T., Chiancone E. & Forsen S. (1982): Characterisation of cation-binding sites on Panulirus interruptus hemocyanin by ^{43}Ca and ^{23}Na NMR.
Eur.J.Biochem. 125 , 103-108.
- Antonini E. & Chiancone E. (1977): Assembly of multisubunit respiratory proteins.
Ann.Rev.Biophys.Bioeng. 6 , 239-271.
- Arisaka F. & Van Holde K.E. (1979): Allosteric properties and association equilibria of hemocyanin from Callinassa californiensis. J.Mol.Biol. 134 , 41-73.
- Blangly D., Buc H. & Monod J. (1968): Kinetics of the allosteric interactions of phosphofructokinase from Escherichia coli. J.Mol.Biol. 31 , 13-35.
- Brenner S. & Horne R.W. (1959): A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. Biochim.Biophys.Acta 34 , 103-110.
- Brenowitz M., Bonaventura C. & Bonaventura J. (1984): Comparison of the physical and functional properties of the 48-subunit native molecule and the 24- and 12-subunit dissociation intermediates of Limulus polyphemus hemocyanin. Biochemistry 23 , 879-888.
- Brouwer M., Bonaventura C. & Bonaventura J. (1977): Oxygen binding of Limulus polyphemus hemocyanin: allosteric modulation by chloride ions.
Biochemistry 16 , 3897-3902.
- Brouwer M., Bonaventura C. & Bonaventura J. (1978): Analysis of the effect of three different allosteric ligands on oxygen binding by hemocyanin of the shrimp Penaeus setiferus. Biochemistry 17 , 2148-2154.
- Buc H., Johannes J. & Hess B. (1973): Allosteric kinetics of pyruvate kinase of Saccharomyces carlsbergensis. Appendix J.Mol.Biol. 76 , 199-205.
- Colosimo A., Brunori M. & Wyman J. (1974): Concerted changes in allosteric macromolecules.
Biophys.Chem. 2 , 338-344.
- Decker H. (1981): Zur Quartärstruktur und Sauerstoffbindung beim Hämocyanin aus der Vogelspinne Eurypelma californicum. Dissertation, Universität München.

- Decker H., Schmid R., Markl J. & Linzen B. (1980): Hemocyanins in spiders, XII. Dissociation and reassociation of *Eurypelma hemocyanin*. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 361 , 1707-1717.
- Decker H., Savel A., Linzen B. & Van Holde K.E. (1983): A new graphical test for the MWC-model and its application to some hemocyanins. Life Chem.Rep., Suppl. 1 , 251-256.
- Edsall J.T., Felsenfeld G., Goodman D.S. & Gurd F.R.N. (1954): The association of imidazole with the ions of zinc and cupric copper. J.Amer.Chem.Soc. 76 , 3054-3058.
- Ellerton H.D., Ellerton N.F. & Robinson H.A. (1983): Hemocyanin - a current perspective. Progr.Biophys.Mol.Biol. 41 , 143-258.
- Elwing H., Nilsson L.-A. & Ouchterlony Ö. (1977): A simple spot technique for thin layer immunoassays (TIA) on plastic surfaces. J.Imm.Meth. 17 , 131-145.
- Ferguson K.A. (1964): Metabolism 13 , 985-1002.
- Forlani L., Kuiper K.A. & Brunori M. (1979): Ligand linkage phenomena in hemocyanins. Ital.Soc.Biophys. Mol.Biol., Congress Napoli.
- Gerhard J.C. & Schachman H.K. (1965): Distinct subunits for the regulation and catalytic activity of aspartate transcarbamylase. Biochemistry 4 , 1054-1062.
- Ghiretti F. (1968): Physiology and biochemistry of hemocyanins. London and New York, Academic press.
- Gross B. (1982): Untersuchungen zur Alterung des nativen und dissoziierten Hämocyanins der Vogelspinne *Eurypelma californicum*. Zulassungsarbeit, Universität München.
- Hertl H. (1979): Die Bindung von Calcium und Magnesium an das Hämocyanin der Vogelspinne. Zulassungsarbeit, Universität München.
- Hill A.V. (1910): The possible effects of the aggregation of the molecules of hemoglobin on its dissociation curves. J.Physiol. 40 , IV-VII.
- Hüfner G. (1903): Arch.Ges.Physiol. (Pflügers) 217.

- Imai K. (1973): Analysis of oxygen equilibria of native and chemically modified human adult hemoglobins on the basis of Adair's stepwise oxygenation theory and the allosteric model of Monod, Wyman and Changeux. *Biochemistry* 12 , 798-806.
- Johannes K.J. & Hess B. (1973): Allosteric kinetics of pyruvate kinase of *Saccharomyces carlsbergensis*. *J.Mol.Biol.* 76 , 181-205.
- Johnson G. & Garvey J.S. (1977): Improved methods for separation and purification by affinity chromatography. *J.Imm.Meth.* 15 , 29-37.
- Kekwick R.A. (1940): The serum proteins in multiple myelomatosis. *Biochem.J.* 34 , 1248-1249.
- Kempton B. (1983): Die Anwendung spezifischer Antikörper zur Untersuchung eines Spinnen-Hämocyanins: Quartärstruktur, Verwandtschaftsbeziehungen, Biosyntheseort. Dissertation, Universität München.
- Klarman A., Shaklai N. & Daniel E. (1975): Oxygen binding by hemocyanin from *Levantina hierosolima* I. Exclusion of subunit interactions as a basis for cooperativity. *Biochemistry* 14 , 102-104.
- Koshland D.E. jr., Nemethy G. & Filmer D. (1966): Comparison of experimental binding data and theoretical models of proteins containing subunits. *Biochemistry* 5 , 356-387.
- Kroll J. (1973): Crossed-line immunoelectrophoresis. *Scand. J. Immunol.* 2 , Suppl. 1, 79-81.
- Kroll J. (1973): Tandem-crossed immunoelectrophoresis. *Scand. J. Immunol.* 2 , Suppl. 1, 57-59.
- Krüger M. & Hess B. (1968): Die Empfindlichkeit der Fructosediphosphat-Bindungsstelle von Hefe-Pyruvatkinase gegenüber Anti-Pyruvatkinase. *Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.* 349 , 104-106.
- Kuiper H.A., Forlani L., Chiancone E., Antonini E., Brunori M. & Wyman J. (1979): Multiple linkage in *Panulirus interruptus* hemocyanin. *Biochemistry* 18 , 5849-5854.
- Laemmli U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature (London)* 227 , 680-695.

- Lamy J., Bijlholt M.M.C., Sizaret P.-Y., Lamy J. & van Bruggen E.F.J. (1981): Quaternary structure of scorpion (*Androctonus australis*) hemocyanin. Localization of subunits with immunological methods and electron microscopy. *Biochemistry* 20 , 1849-1856.
- Lamy J., Lamy J. & Weill J. (1979): Arthropod hemocyanin structure: Isolation of eight subunits in the scorpion. *Arch.Biochem.Biophys.* 193 , 140-149.
- Laurell C.B. (1965): Antigen-antibody crossed electrophoresis. *Anal.Biochem.* 10 , 358.
- Loewe R. (1972): Hämocyanin in der Hämolymphe zweier Spinnen, *Dugesia californica* und *Cupiennius salei* Keyserling. Dissertation, Universität München.
- Loewe R. (1978): Hemocyanins in spiders, V. Fluorimetric recording of oxygen binding curves, and its application to the analysis of allosteric interactions in *Eurypelma californicum* hemocyanin. *J.Comp.Physiol.* 128 , 161-168.
- Loewe R. & Linzen B. (1973): Hemocyanins in spiders I. Subunits and stability region of *Dugesia californicum* hemocyanin. Hoppe Seyler's *Z.Physiol.Chem.* 354 , 182-188.
- Loewe R. & Linzen B. (1975): Haemocyanins in spiders, II. Automatic recording of oxygen binding curves, and the effect of Mg++ on oxygen affinity, cooperativity, and subunit association of *Cupiennius salei* haemocyanin. *J.Comp.Physiol.* 98 , 147-156.
- Mangum C.P. (1983): Oxygen transport in the blood. In: *The biology of the crustacea* (Bliss D.E. & Mantel L.H., eds.) 5 , Acad.Press.
- Michaelides M.C., Sherman R. & Helmreich E. (1964): The interaction of muscle phosphorylase with soluble antibody fragments. *J.Biol.Chem.* 239 , 4171-4181.
- Marsh S.C., Patikh J. & Cuatrecasas P. (1974): A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography. *Anal.Biochem.* 60 , 149-152.
- Markl J. (1980): Hemocyanins in spiders, XI. The quaternary structure of *Cupiennius* hemocyanin. Hoppe-Seyler's *Z.Physiol.Chem.* 140 , 199-207.

- Markl J., Strych W., Schartau W., Schneider H.-J., Schöberl P. & Linzen B. (1979): Hemocyanins in spiders, VI. Comparison of the polypeptide chains of *Eurypelma californicum* hemocyanin. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 360 , 639-650.
- Markl J., Savel A., Decker H. & Linzen B. (1980): Hemocyanins in spiders, IX. Homogeneity, subunit composition and the basic oligomeric structure of *Eurypelma californicum* hemocyanin. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 361 , 649-660.
- Markl J., Bonaventura C. & Bonaventura J. (1981a): Hemocyanins in spiders, XIII. Kinetics of oxygen dissociation from individual subunits of *Eurypelma* and *Cupiennius* hemocyanin. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 362 , 429-437.
- Markl J., Savel A., Linzen B. (1981b): Hemocyanins in spiders, XIV. Subunit composition of dissociation intermediates and its bearing on quaternary structure of *Eurypelma* hemocyanin. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 362 , 1255-1262.
- Markl J., Kempter B., Linzen B., Bijlholt M.M.C & van Bruggen E.F.J. (1981c): Hemocyanins in spiders, XVI. Subunit topography and a model of quaternary structure of *Eurypelma* hemocyanin. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 362 , 1631-1641.
- Markl J., Decker H., Linzen B., Schutter W.G. & van Bruggen E.F.J. (1982): Hemocyanins in spiders, XV. The role of the individual subunits in the assembly of *Eurypelma* hemocyanin. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 363 , 73-87.
- Maurer H.R. (1968): Disk-Elektrophorese. Walter de Gruyter, Berlin.
- Monod J., Wyman J. & Changeux J.-P. (1965): On the nature of allosteric transition: A plausible model. J.Mol.Biol. 12 , 88-118.
- Nahke P. (1984): Strukturchemische Untersuchungen an Untereinheiten des Hämocyanins der Vogelspinne *Eurypelma californicum*. Dissertation, Universität München.
- Ouchterlony Ö. (1958): Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. Progr.Allergy 5 , 1-78.
- Perutz M.F. (1970): Stereochemistry of cooperative effects in hemoglobin. Nature 228 , 726-734.

- Porter R.R. (1959): The hydrolysis of rabbit-globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem.J.* 73 , 119-126.
- Redfield A.C. (1930): The equilibrium of oxygen with the hemocyanin of *Limulus polyphemus* determined by a spectrophotometric method. *Biol.Bull.* 58 , 238-255.
- Rubin M.M. & Changeux J.-P. (1966): On the nature of allosteric transitions: Implications of non-exclusive ligand binding. *J.Mol.Biol.* 21 , 265-274.
- Schmid R. (1976): Chemisch-physikalische Untersuchungen an Spinnenhämocyaninen und ihren Untereinheiten. Dissertation, Universität München.
- Schneider H.-J. (1978): Über die Heterogenität der Untereinheiten des Hämocyanins aus der Vogelspinne *Eurypelma californicum*. Dissertation, Universität München.
- Schneider H.-J., Markl J., Schartau W. & Linzen B. (1977): Hemocyanins in spiders, IV. Subunit heterogeneity in *Eurypelma* (*Dugesia*) hemocyanin, and separation of polypeptide chains. *Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.* 358 , 1133-1141.
- Stöcker W. (1984): Immunologische Verwandtschaft und Quartärstruktur von Crustaceen-Hämocyaninen. Dissertation, Universität München.
- Van Driel R. (1973): Oxygen binding and subunit interactions in *Helix pomatia* hemocyanin. *Biochemistry* 12 , 2696-2698.
- Van Holde K.E. & van Bruggen E.F.J. (1971): The hemocyanins. In: *Biological macromolecules* 5 (Timasheff S.N. & Fasman G.D., eds.), Marcel Dekker, New York.
- Van Holde K.E. & Miller K.J. (1982): Haemocyanins. *Quart.Rev.Biophys.* 15 , No.1, 1-129.
- Weber K. & Osborn M. (1969): The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis. *J.Biol.Chem.* 244 , 4406-4412.
- Weeke B. (1973): Crossed immunoelectrophoresis. *Scand. J. Immunol.* 2 , Suppl. 1, 47-59.
- Weir D.M. (1979): Handbook of experimental immunology. Vol. 1: Immunochemistry. Blackwell Scientific Publ., Oxford, London, Edinburgh, Melbourne.
- Zolla L., Kuiper H.A., Vecchini P., Antonini E. & Brunori M. (1978): Dissociation and oxygen-binding behavior of β -hemocyanin from *Helix pomatia*. *Eur.J.Biochem.* 87 , 467-473.

Lebenslauf

Ich, Anette Savel, geb. Tögel, wurde am 21.3.1955 in Erlangen/Bayern geboren. Meine Eltern sind: Kurt Tögel, Dipl. Physiker, geboren am 1.2.1925 in Sillain, CSSR, und Edeltraut Tögel, geb. Stowasser, Lehrerin, geboren am 6.4.1927 in Karlsbad, CSSR.

1956 zogen wir nach Karlsruhe um. Dort besuchte ich von 1962 bis 1966 die Drais-Volksschule und von 1966 bis 1974 das Lessinggymnasium. Im Mai 1974 legte ich die Reifeprüfung mit der Note 1,5 ab.

Vom Wintersemester 1974/1975 bis zum Wintersemester 1976/77 war ich an der Universität Karlsruhe für den Studiengang Biologie/Chemie für das höhere Lehramt eingeschrieben. Im Oktober 1976 bestand ich die Zwischenprüfung in den Fächern Biologie und Chemie.

1977 zog ich nach München um und bin seit dem Sommersemester 1977 an der Universität München für den gleichen Studiengang eingeschrieben. Im Frühjahr 1980 bestand ich das Staatsexamen in den Fächern Biologie und Chemie.

Seit August 1980 arbeite ich an der vorliegenden Promotionsarbeit.

Ich bin seit Mai 1979 mit Ulrich Savel, geboren am 22.12.1951 in Augsburg verheiratet.

